

NARAH COSTA VITARELLI

**ANATOMIA FOLIAR COMO SUBSÍDIO PARA A SISTEMÁTICA DE *Croton*
L. (SEÇÕES *Cleodora* E *Lamprocroton*), EUPHORBIACEAE**

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
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V837a
2013

Vitarelli, Narah Costa, 1982-

Anatomia foliar como subsídio para a sistemática de *Croton*
L. (seções *Cleodora* e *Lamprocroton*), Euphorbiaceae / Narah
Costa Vitarelli. — Viçosa, MG, 2013.
xi, 155 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renata Maria Strozi Alves Meira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Folhas - Anatomia. 2. Secreção. 3. Filogenia.
4. *Lamprocroton*. 5. *Cleodora*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-Graduação em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.69

NARAH COSTA VITARELLI

**ANATOMIA FOLIAR COMO SUBSÍDIO PARA A SISTEMÁTICA DE *Croton*
L. (SEÇÕES *Cleodora* E *Lamprocroton*), EUPHORBIACEAE**

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: 05 de março de 2013.



Aristéa Alves Azevedo



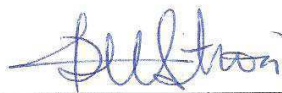
Maria Beatriz Rossi Caruzo



Ricarda Riina



Inês Cordeiro
(Coorientadora)



Renata Maria Strozi Alves Meira
(Orientadora)

Ao Divino Vitarelli, à Inês Mollica Vitarelli, ao Ronaldo Vitarelli e à Denise Maria Costa
Dedico.

Nasci pra ser ignorante.
Mas os parentes teimaram
(e dali não arrancaram)
em fazer de mim estudante.

Que remédio? Obedeci.
Há já três lustros que estudo.
Aprender, aprendi tudo,
mas tudo desaprendi.

Perdi o nome às Estrelas,
aos nossos rios e aos de fora.
Confundo fauna com flora.
Atrapalham-me as parcelas.

Mas passo dias inteiros
a ver um rio passar.
Com aves e ondas do Mar
tenho amores verdadeiros.

Rebrilha sempre uma Estrela
por sobre o meu parapeito;
pois não sou eu que me deito
sem ter falado com ela.

Conheço mais de mil flores.
Elas conhecem-me a mim.
Só não sei como em latim
as crismaram os doutores.

No entanto sou promovido,
mal haja lugar aberto,
a mestre: julgam-me esperto,
inteligente e sabido.

O pior é se um director
espreita pela fechadura:
lá se vai a licenciatura
se ouve as lições do doutor.

Lá se vai o ordenado
de tuta e meia por mês,
Lá fico eu de uma vez
um Poeta desempregado.

Se me não lograr o fado,
porém, com tais directores,
e de rios, aves e flores
somente for vigiado,

enquanto as aulas correrem
não sentirei calafrios,
que flores, aves e rios
ignorante é que me querem.

Sebastião da Gama/ Giovanna Giuliano

AGRADECIMENTOS

De fé a fé, agradeço a Deus, quem em som, em luz, em água, em vida ilumina caminhos a cada nascer e por do sol;

Aos meus pais, Ronaldo Vitarelli e Denise Maria Costa, pela vida, conselhos, carinhos, valores, por me ensinarem a olhar para o céu como um passarinho, que quer voar alto (e voa!) sem jamais deixar o seu ninho.

Às minhas irmãs, Camila, Lara e Paloma, minhas partes melhores, meus amores, meu chão;

Ao Vovô Divino e à Vovó Inês, inspiração, exemplo, luta, carinho e sonho;

Ao Diego, o par na vida, o conselheiro, o colo, o amor;

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, onde cresci e vivi, por me ensinar a amar a Biologia, por fazer de mim Bióloga, professora, pesquisadora e agora doutora. Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Botânica pela infraestrutura disponibilizada para a realização da pesquisa;

Aos professores do departamento de Biologia Vegetal/Anatomia Vegetal, ao prof. Wagner Otoni, pelos conselhos (nos projetos de pesquisa e no futebol); ao prof. Edgard Picoli, pelo companheirismo na disciplina BVE-210; à prof^a. Marília Ventrella, por aulas tão inspiradoras e por me ensinar a ensinar a Anatomia Vegetal no universo da Agronomia; à prof^a. Luzimar Silva, pela amizade, companheirismo e por apontar caminhos a serem seguidos (não posso deixar de agradecer aos seus filhos Guilherme e Gustavo pela amizade. Sim e, claro, pelos pirulitos de chocolate e balinhas que salvaram muitas tardes enganando a fome quando as trocas de álcool, corantes e micrófono não nos davam tempo para um lanche); à prof^a. Aristéia Alves, exemplo de mulher na ciência, sabedoria e carinho são as palavras que me vem à cabeça para defini-la. Saber muitos sabem, aí está o mundo cheio de livros e artigos para quem quiser buscar. Mas poucos conseguem transmitir o conhecimento com tamanha dedicação, didática, conteúdo e prática, ou mesmo com tanto carinho por fazê-lo.

Agradeço em especial à prof^a. Renata Meira, minha orientadora desde 2003, quem me ensinou o beabá da Anatomia e hoje me forma como doutora. Foi uma longa jornada juntas e, por esse caminho, nela sempre me espelhei por me orgulhar da pessoa maravilhosa que é, pela amizade, pelo carinho, pelo conhecimento e pela enorme experiência de uma eterna jovem pesquisadora. Em cada livro de Anatomia que abro escuto a sua voz. E assim sempre será!

Agradeço à ‘equipe do *Croton*’, sem a qual este projeto jamais teria sido realizado. Além da professora Renata Meira, agradeço à Dra. Inês Cordeiro, pelo carinho em esclarecer sempre sobre o mundo dos Crotons, pelas colaborações durante a elaboração e realização do projeto de doutorado, pela identificação do material taxonômico, pelo envio de amostras do material herborizado e pelo estímulo para a realização do estágio de doutorado sanduíche. À Beatriz Caruzo, pela atenção sempre carinhosa às minhas dúvidas, por me apresentar ao universo *Cleodora*, por fornecer amostras do material herborizado e dados de morfologia externa, utilizados na construção das matrizes morfológicas, e pela colaboração eficiente, mesmo que à distância, no desenvolvimento das análises filogenéticas. À Dra. Ricarda Riina, pelos maravilhosos meses de convivência e intenso aprendizado no *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

(CSIC) – *Real Jardín Botánico de Madrid*. Obrigada Ricarda por me ensinar tudo que sei sobre filogenia (ainda que eu tenha um longo caminho a percorrer neste novo e fascinante universo!), pela paciência de, a cada dia, passo a passo, ir me apontando as direções, me deixando aprender por tentativas e erros, pelas inúmeras dúvidas sempre respondidas com atenção e pela dedicação incansável a este projeto. Muito obrigada pela amizade e pelo carinho.

Agradeço aos demais membros e amigos do CSIC, em especial ao Dr. Javier Fuertes Aguilar, pela enorme hospitalidade e pela colaboração ao disponibilizar toda a estrutura do laboratório de Sistemática Molecular do CSIC para a realização das etapas de sequenciamento do DNA; à Fátima Duran e Irene Machío pelo acompanhamento nos protocolos laboratoriais; à Angélica Bello e Li-fang Zang pela agradável companhia; ao querido Paco (Dr. Francisco de Diego Calonge) pelas deliciosas conversas matinais, pela amizade e pela fantástica e inesquecível visita à sua linda cidade natal “*Chinchón*”.

Aos anjinhos que conheci em Madrid: Xime e Lina (*amiguitas-hermanas*), Cristian, Naira, Gui e Claudinha. Obrigada pela amizade que levaremos para o resto de nossas vidas. A saudade é enorme, mas o mundo é pequeno para nós!

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV pelo companheirismo no dia a dia de trabalho e demais amigos da Botânica (Gáu, Carol, Pri, Magnago, Fábio, Vítor, Clébio, Rolim e cia Ltda...) pelas viagens de campo, festas e rodas de violão. Agradecimentos especiais à Deborah, pelas trocas de experiência com *Croton* e pela amizade, ao Pedrão, ao Tica, à Moranguinho, à Laíza, à Elisa e à doce Laís, pela amizade sincera e boas conversas (principalmente num café da tarde na casa da vovó) e à amigona Cathie, pela alegria contagiante e energia radiante que ultrapassam os Andes como se Chile e Brasil não fossem separados por uma cordilheira. Meu muito obrigada às nossas queridas técnicas Aurora e Patrícia e também à Amanda, quem tanto me ajudou durante o processamento das amostras e coletas em campo, à Dani e ao Samuca pelos lindos cortes à mão livre. Ao nosso eficiente seretário Ângelo, por nos auxiliar sempre com muita disposição e alegria.

Às minhas amigas-irmãs na vida: Mônica, Gáu, Dedê, Flavitia (meu porto seguro em Madrid), Lih, Mari, Bela e Jussa.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutoramento e ao programa PDSE/CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (processo nº 0023/12-4).

Ao IEF (Instituto Estadual de Floresta) pela licença de coleta.

Ao *Croton* por me proporcionar chegar até aqui, permeando por caminhos que me levaram a conhecer estas pessoas tão especiais e lugares maravilhosos (desde as Serras de Minas Gerais aos campos *madrileños*).

SUMÁRIO

	Pg
Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	4
Capítulo I: “Diversidade de Estruturas Secretoras em <i>Croton</i> (Euphorbiaceae) seções <i>Cleodora</i> e <i>Lamprocroton</i> ”.....	6
Resumo.....	7
Introdução.....	8
Material e Métodos.....	10
Resultados.....	13
Discussão.....	20
Conclusões.....	29
Referências Bibliográficas.....	35
Apêndice I: lista de espécies, voucher (herbário) e número do coletor.....	41
Capítulo II: “Evolução dos caracteres estruturais foliares no gigante gênero <i>Croton</i> (Euphorbiaceae): um estudo de caso da seção <i>Cleodora</i> ”.....	42
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	49
Discussão.....	59
Conclusões.....	70
Referências Bibliográficas.....	81
Apêndice I: taxa, voucher, herbário e número de acesso no GenBank.....	87
Apêndice II: caracteres e estados de caráter utilizados.....	88
Capítulo III: “Caracteres anatômicos foliares de <i>Croton</i> seção <i>Lamprocroton</i> (Euphorbiaceae): filogenia e reconstruções dos estados ancestrais”.....	89
Resumo.....	90
Introdução.....	91
Material e Métodos.....	93
Resultados.....	98
Discussão.....	104
Conclusões.....	114
Referências Bibliográficas.....	121
Apêndice I: número de acesso no GenBank.....	127
Apêndice II: Caracteres e estados de caráter utilizados.....	128
Capítulo IV: “Estrutura e desenvolvimento ontogenético dos apêndices foliares em <i>Croton erythroxylodes</i> Baill., <i>C. pygmaeus</i> L.R. Lima e <i>C. splendidus</i> Mart. (Euphorbiaceae): uma abordagem funcional e ecológica”.....	129
Resumo.....	130
Introdução.....	131
Material e Métodos.....	132
Resultados.....	135
Discussão.....	139
Conclusões.....	146
Referências Bibliográficas.....	151
Conclusão Geral.....	155

	LISTA DE FIGURAS	Pg
Capítulo I		
Figuras 1 a 20.....		31
Figuras 21 a 33.....		33
Figuras 34 a 44.....		34
Capítulo II		
Figura 1.....		71
Figura 2.....		72
Figura 3.....		73
Figura 4.....		74
Figura 5.....		75
Figura 6.....		76
Figura 7.....		77
Figura 8.....		78
Figura 9.....		79
Capítulo III		
Figura 1.....		116
Figura 2.....		117
Figura 3.....		118
Figura 4.....		119
Figura 5.....		120
Capítulo IV		
Figuras 1 a 8.....		147
Figuras 9 a 18.....		148
Figuras 19 a 24.....		150

LISTA DE TABELAS		Pg
Capítulo I		
Tabela 1: Lista de espécies e distribuição das estruturas secretoras.....		14
Tabela 2: Classificação do tipo de nectário em cada espécie.....		18
Capítulo III		
Tabela 1: Taxa e voucher estudados.....		94
Capítulo IV		
Tabela 1: natureza química das substâncias encontradas na parede celular de distintas regiões dos apêndices estudados.....		138

RESUMO

VITARELLI, Narah Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2013, **Anatomia foliar como subsídio para a sistemática de *Croton* L. (seções *Cleodora* e *Lamprocroton*), *Euphorbiaceae***. Orientadora: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-orientadora: Inês Cordeiro.

O gênero *Croton* L. se destaca na família *Euphorbiaceae* pelo elevado número de espécies, acentuada diversidade morfológica e distribuição predominantemente tropical. As espécies de *Croton* também exibem uma grande quantidade de compostos químicos. A taxonomia e a sistematização de *Croton* são complexas devido ao grande número de espécies, a diversidade morfológica, a ampla distribuição geográfica e a falta de distintas sinapomorfias morfológicas para as suas seções. *Croton* foi organizado em 40 seções com base em caracteres morfológicos, entretanto análises filogenéticas moleculares têm demonstrado que muitas destas seções não são monofiléticas. As seções *Cleodora* (subseções *Sphaerogyni* e *Spruceani*) e *Lamprocroton* (subseções *Argentini* e *Lamprocroton*) foram revisadas considerando-se dados morfológicos e moleculares. Com base nestes trabalhos, foi realizado um estudo da anatomia foliar das espécies da seção *Cleodora*, seção *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* e grupos externos relacionados. A partir deste estudo foi elaborada uma matriz de dados com os caracteres anatômicos diagnósticos. Essa matriz foi combinada com matrizes de dados moleculares e, em alguns casos, também morfológicos em análises filogenéticas utilizando-se Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB). Foi feita a Reconstrução do Estado de Caráter Ancestral de cada um dos caracteres anatômicos. Os resultados do presente trabalho mostram que a utilização de caracteres anatômicos em análises filogenéticas contribui com o esclarecimento acerca das relações entre as espécies de *Croton*. Foi possível inferir sobre os mecanismos de evolução das estruturas vegetativas, relacionando a história evolutiva das distintas linhagens do gênero e os processos adaptativos de suas espécies. Indumentos em folhas de algumas espécies de *Croton* correspondem a uma estrutura multicelular complexa, adaptada à absorção e distribuição de água nas folhas. Além da importância ecológica, estruturas foliares das espécies estudadas podem subsidiar as interpretações filogenéticas. Os caracteres anatômicos foliares, em especial as estruturas secretoras, contribuem com o esclarecimento da história evolutiva nas duas linhagens de *Croton* estudadas e possibilitam inferir sobre as interrelações entre as suas espécies. Os caracteres anatômicos mostraram-se relevantes na resolução da topologia dos ramos internos na

seção *Cleodora* e elevam os valores de suporte destes ramos, contribuindo com o esclarecimento acerca das relações entre as espécies desta seção. As espécies da subseção *Lamprocroton* (seção *Lamprocroton*) mostram grande semelhança estrutural e molecular (mediante os marcadores utilizados, ITS e *trnL-trnF*), evidenciando relações pouco claras entre suas espécies tanto nas análises de filogenia molecular quanto nas análises combinando dados anatômicos e moleculares. Embora os caracteres anatômicos não tenham sido suficientes para resolver a politomia evidenciada na subseção *Lamprocroton* pela filogenia molecular, foram importantes para dar apoio a este clado. Os resultados do presente trabalho revelam um novo posicionamento dentro da seção *Lamprocroton* com a saída de *C. pygmaeus* da subseção *Lamprocroton* e sua circunscrição na subseção *Argentini*. Verifica-se ainda a necessidade de remoção de *C. imbricatus* da seção *Lamprocroton*, sendo sugerido um possível posicionamento para esta espécie dentro do gênero *Croton*.

ABSTRACT

VITARELLI, Narah Costa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2013, **Leaf anatomy as a additional tool for *Croton* L. sistematic (sections *Cleodora* and *Lamprocroton*), Euphorbiaceae.** Advisor: Renata Maria Strozi Alves Meira. Co-Advisor: Inês Cordeiro.

Croton L. (Euphorbiaceae) is one of the largest genera of flowering plants, has a elevated species number, a great morphological diversity and broad distribution (predominantly tropical). *Croton* has a great variety of chemical compounds. Its large size, great morphological diversity, broad distribution and the lack of morphological synapomorphies made difficult its taxonomy and systematics. The genus was divided into 40 sections defined by a suit morphological characters, however molecular phylogenetic analyzes have shown that many of these sections are not monophyletic. The sections *Cleodora* (subsections *Sphaerogyni* and *Spruceani*) and *Lamprocroton* (subsections *Argentini* and *Lamprocroton*) were reviewed considering morphological and molecular data. Based on this work, we studied leaf anatomy of species of section *Cleodora*, section *Lamprocroton* subsection *Lamprocroton* and related out group. A data matrix was built with the diagnostic anatomical characters. This matrix was combined with the molecular data matrix and, in some cases, with the morphological data in phylogenetic analisis using Maximum Parsimony (MP) and Bayesian Inference (BI). We performed a Ancestral Character State Reconstruction using the anatomical characters. The results of this study show that the use of anatomical characters in phylogenetic analysis contributes to the clarification of the relationships between species of *Croton* and allow us to understand mechanisms of evolution of vegetative structures. Leaf trichomes of some *Croton* species correspond to a complex multicellular structure, adapted to the foliar water uptake. Besides the ecological importance of the species studied leaf structures can support the phylogenetic interpretations. The leaf anatomical characters, especially the secretory structures, contribute to the clarification of the evolutionary history of *Croton* and clarify interrelationships among their species. The anatomical characters were relevant in resolving the topology of internal branches in section *Cleodora* and increasing node support, contributing to the clarification of the relationships between species in this section. The species of subsection *Lamprocroton* (sect. *Lamprocroton*) show very similar structural and molecular (on the markers used, ITS and *trnL-trnF*) showing unclear relationships between species in both molecular phylogeny analisis and combining molecular and anatomical data analisis. Although the anatomical characters

have not been sufficient to resolve the polytomy in subsection *Lamprocroton*, they were important to clarifying relationships among species. The results of this study reveal a new position within the section *Lamprocroton* with the exclusion of *C. pygmaeus* from subsect. *Lamprocroton* and its new recircumscription in subsect. *Argentini*. *Croton imbricatus* should be removed from sect. *Lamprocroton* to another section within *Croton*. We suggest possibilities for *C. imbricatus* new position in *Croton*.

INTRODUÇÃO GERAL

A Importância do Estudo das seções *Cleodora* e *Lamprocroton*

Croton é um dos maiores gêneros dentre as Angiospermas com 1.223 espécies descritas no ‘The World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae’ (Govaerts *et al* 2000). Estimativas taxonômicas indicam que apenas 57 gêneros de Angiospermas apresentam mais do que 500 espécies (Frodin 2004). O estudo de grandes gêneros constitui-se num grande desafio e oportuniza investigações acerca de fenômenos evolutivos (Berry *et al* 2005).

A amplitude de distribuição geográfica, o evidente polimorfismo e o grande número de espécies dificultam a caracterização e circunscrição das espécies de *Croton*, problema enfatizado por diversos autores (Berry *et al* 2005; Lima & Pirani 2008; Riina *et al* 2009). Tais características fazem com que esse gênero seja o principal desafio taxonômico das Euphorbiaceae na região neotropical (Caruzo 2010).

Webster (1993) publicou uma sinopse na qual organizou *Croton* em 40 seções, acrescentando seções àquelas propostas por Baillon (1858, 1864) e Grisebach (1864). Esta sinopse, tratada pelo próprio autor como provisória, é ainda utilizada como objeto base de estudo por pesquisadores que trabalham com o gênero. Entretanto, apesar de sua grande contribuição para a organização infragenérica de *Croton*, esta sinopse leva em consideração apenas caracteres morfológicos e muitas das seções propostas foram identificadas como não monofiléticas (Berry *et al* 2005). Estudos de filogenia molecular têm contribuído consideravelmente para a construção de uma organização mais natural para os níveis infragenéricos de *Croton*. Apenas dois trabalhos de filogenia molecular mostram uma análise abrangente para o gênero, incluindo representantes da maioria das seções (Berry *et al* 2005; Van Ee *et al* 2011). Quanto ao esclarecimento acerca das interrelações entre as espécies dentro de cada seção os trabalhos de filogenia molecular têm focado as análises em clados mais restritos e os grupos externos associados (Riina *et al* 2009, 2010b; Van Ee & Berry 2009, 2010, 2011; Caruzo *et al* 2011). Esta estratégia de estudo tem se mostrado bastante eficiente, dado o elevado número de espécies de *Croton*.

A utilização de dados moleculares não foi suficiente para resolver totalmente as relações filogenéticas em *Croton* (Van Ee *et al* 2011) e a anatomia vegetal, assim como a morfologia e demais áreas da botânica se constituem em ferramentas adicionais para a compreensão das interrelações entre as espécies de *Croton* e de sua história evolutiva.

Dentre as seções de *Croton* que foram revisadas com base em dados moleculares as seções *Cleodora* e *Lamprocroton* (subseção *Lamprocroton*) se destacam pelo grande número de espécies nos ecossistemas brasileiros. As espécies de *Cleodora* são arbustivas ou arbóreas e ocorrem na Mata Atlântica ou na Amazônia (Caruzo *et al* 2011) e as espécies de *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* são subarbustivas ou arbustivas, nunca arbóreas, e ocorrem predominantemente na Mata Atlântica em campos rupestres e campos de altitudes, podendo ocorrer também em áreas abertas de Restingas, do Cerrado e da Caatinga (Lima & Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011).

O Brasil é considerado como um dos centros de diversidade de *Croton*, onde o gênero é bem representado com cerca de 350 espécies, distribuídas especialmente em áreas de vegetação aberta, como nos complexos rupestres de altitudes (Lima & Pirani 2008; Caruzo 2010; Caruzo *et al* 2011). Tais ambientes são bem representados no estado de Minas Gerais e ocorrem em locais com grande histórico de devastação. Este Estado compreende importantes Unidades de Conservação (UCs) onde os complexos rupestres de altitude estão inseridos, destacando-se a vegetação de campos de altitude no Parque Nacional do Itatiaia, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro e Parque Nacional do Caparaó e a vegetação de campo rupestre no Parque Estadual do Ibitipoca, Parque Nacional da Serra do Cipó e toda a vegetação rupestre associada à Cadeia do Espinhaço. Algumas destas UCs são localizadas próximas a Universidade Federal de Viçosa, como o Parque Estadual da Serra do Brigadeiro e o Parque Nacional do Caparaó, sendo de grande responsabilidade por parte dos pesquisadores desta instituição o conhecimento da flora destes ambientes.

Com base nos trabalhos de filogenia molecular (Caruzo *et al* 2011; Van Ee *et al* 2011) e revisão taxonômica (Lima & Pirani 2008;), a anatomia foliar das espécies da seção *Cleodora* (subseções *Sphaerogyni* e *Spruceani*) e da seção *Lamprocroton* (subseção *Lamprocroton*) foi analisada, sendo produzido um banco de dados compilando os principais caracteres anatômicos de valor taxonômico e filogenético para estas linhagens de *Croton*. As matrizes construídas com os dados de anatomia foram analisadas em conjunto com matrizes moleculares na tentativa de esclarecer os seguintes questionamentos:

1. Quais são as estruturas secretoras presentes nas folhas das espécies de *Croton*? A presença, o tipo e a posição destas estruturas variam entre as espécies das seções *Cleodora* e *Lamprocroton*? É possível determinar os estados ancestrais para tais estruturas em *Croton* e compreender a história evolutiva das mesmas nestas seções?

2. A otimização dos caracteres anatômicos sobre a filogenia de *Cleodora* e de *Lamprocroton* permite identificar homologias e homoplasias em *Croton* e consequentemente elucidar a história evolutiva destas seções?

3. Em um estudo de Evidência Total, a análise conjunta dos dados moleculares, morfológicos e anatômicos contribui com uma melhor resolução dos ramos nas árvores filogenéticas das seções *Cleodora* e *Lamprocroton* e ajuda a esclarecer as interrelações entre as espécies destas duas linhagens? Ou será que, em *Croton*, os caracteres anatômicos apresentam um alto grau de homoplasia e não contribuem com resoluções filogenéticas em nível infragenérico?

4. A diversidade de tricomas tectores encontrados nas espécies de *Croton* estudadas é relevante para a taxonomia do gênero? É possível determinar os estados ancestrais para os tricomas em *Croton* e compreender a história evolutiva destas estruturas? Existe alguma correlação entre estrutura e função dos tricomas em *Croton*? É possível estabelecer uma relação da presença dessas estruturas e os ecossistemas brasileiros em que as espécies ocorrem?

Com o intuito de responder a esses quatro questionamentos, o trabalho foi organizado em 4 capítulos, os quais foram redigidos na forma de artigos científicos.

Para atingir os objetivos propostos, foram convidados pesquisadores de outras instituições brasileiras e estrangeiras para compor a equipe de trabalho. A Dra. Inês Cordeiro, pesquisadora do Instituto de Botânica de São Paulo (IBT), especialista no gênero *Croton*, a Dra. Maria Beatriz Rossi Caruzo, professora da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), responsável pela execução dos estudos sobre a filogenia molecular da seção *Cleodora* e Dra. Ricarda Riina, pesquisadora do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC – Real Jardín Botánico de Madrid)*, especialista nas áreas de Sistemática Molecular, Evolução, Taxonomia, Biogeografia e Florística com ênfase nos dois grandes gêneros de Euphorbiaceae (*Euphorbia* e *Croton*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baillon, H. 1858. **Etude générale du groupe des Euphorbiacées**. Victor Masson, Paris.
- Baillon, H. 1864. Euphorbiacees Americaines. **Adansonia** 4: 257-377.
- Berry, P.E.; Hipp, A.L.; Wurdack, K.J.; VanEe, B. & Riina, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** 92: 1520-1534.
- Caruzo, M.B.R. 2010. **Sistemática de *Croton* sect. *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s.)**. Tese de Doutorado, Departamento de Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- Caruzo, M. B. R.; Van Ee, B. W.; Cordeiro, I.; Berry, P. E. & Riina, R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in “Sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 60: 193-206.
- Frodin, D. 2004. History and Concepts of Big Plant Genera. **Taxon** 53: 753-776.
- Grisebach, A.H.R. 1864. ***Croton***. In: Flora of the British West Indian Island (Grisebach, A.H.R. ed.), London. 37-42.
- Govaerts, R.; Frodin, D.G. & Radcliffe-Smith, A. 2000. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Vol. 2. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** 8: 21-75.
- Riina, R.; Berry, P.E. & Van Ee, B.W. 2009. Molecular phylogenetics of the Dragon’s Blood *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany** 34(2): 360-374.
- Riina, R.; Van Ee, B.W.; Wiedenhoeft, A.C.; Cardozo, A. & Berry, P.E. 2010b. Sectional rearrangement of arborescent clades of *Croton* (Euphorbiaceae) in South America: Evolution of arillate seeds and a new species, *Croton domatifer*. **Taxon** 59: 1147-1160.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2009. The circumscription of *Croton* sect. *Crotonopsis* (Euphorbiaceae), a north american endemic. **Harvard Papers in Botany** 14: 61-70.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2010. Taxonomy and phylogeny of *Croton* section *Heptallon* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany** 35: 151-167.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2011. *Croton* section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a novel new world group, and a new subsectional classification of *Croton* section *Lamprocroton*. **Systematic Botany** 36: 88-98.

- Van Ee, B.W.; Riina, R. & Berry, P.E. 2011. A revised infragenérico classification and molecular phylogeny of new world *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **60**: 1-33.
- Webster, G.L. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **42**: 793-823.

Capítulo I:
“Diversidade de estruturas secretoras em *Croton*
(Euphorbiaceae) seções *Cleodora* e *Lamprocroton*”

Diversidade de estruturas secretoras em *Croton* (Euphorbiaceae) seções *Cleodora* e *Lamprocroton*

Resumo: *Croton* se destaca pela sua diversidade de compostos químicos e ampla utilização medicinal de seus órgãos vegetativos por comunidades tradicionais. Muitos compostos químicos já foram identificados, entretanto, poucos são os estudos de anatomia vegetal que descrevem as estruturas responsáveis pela secreção destes metabólitos secundários. Foi feita a investigação anatômica das folhas de 28 espécies de *Croton* (12 da seção *Cleodora*, 11 da seção *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* e 5 espécies que compõem um grupo externo), de *Astraea lobata* e de *Brasilicroton mamoninha*. Foram identificadas 5 tipos de estruturas secretoras com distribuição e morfologia variadas: laticíferos, coléteres, nectários extraflorais, idioblastos secretores e tricomas secretores. A estrutura, o tipo de secreção, a localização e a distribuição de cada uma delas é discutida detalhadamente, sendo feita inferências sobre a sua história evolutiva. As estruturas secretoras foliares em *Croton* apresentam grande importância para a taxonomia e filogenia do gênero.

Palavras chave: Laticíferos, coléteres, nectários, idioblastos secretores, tricomas secretores.

INTRODUÇÃO

Croton L. é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae e se destaca por sua grande diversidade. Suas espécies podem ser herbáceas, arbustivas, lenhosas e ocasionalmente lianas (Webster 1993; Govaerts *et al.* 2000). O gênero está distribuído em trópicos e subtropicais do mundo (Webster 1993; Govaerts *et al.* 2000), mas é na região Neotropical onde está a maior concentração de espécies, tendo como principais centros de diversidade o Brasil, as Antilhas e o México (Burger & Huft 1995, Van Ee *et al.* 2011). Nas regiões de ampla distribuição de *Croton* existem numerosos registros de utilização dessas plantas como medicinais no tratamento de distintas enfermidades (Salatino *et al.* 2007).

É grande a diversidade de compostos químicos identificados em espécies de *Croton*, destacando-se os terpenóides como os metabólitos secundários predominantes. Dentre estes, diversas classes de diterpenos e triterpenos são frequentemente relatadas, não sendo raros, os óleos voláteis compostos por mono e sesquiterpenos. Em muitas espécies de *Croton* foi observada também a ocorrência de diversas classes de alcalóides, de comprovado valor medicinal. Finalmente, compostos fenólicos foram descritos em algumas espécies do gênero, predominando os flavonóides, lignóides e proantocianinas (Salatino *et al.* 2007).

As propriedades medicinais apresentadas por uma espécie vegetal podem estar relacionadas com estruturas secretoras presentes em seus diferentes órgãos (Wagner 1997). As estruturas secretoras em *Croton* podem corresponder aos sítios de síntese e/ou acúmulo de metabólitos secundários com destacado valor fitoquímico e farmacológico, o que atesta a importância de tais estruturas (Fahn 1979; Maciel *et al.* 1998b; Campos *et al.* 2002; Salatino *et al.* 2007; Moreno *et al.* 2009).

A presença de látex em *Croton* é marcante (Metcalf & Chalk 1983; Rudall 1989, 1994; Farias *et al.* 2009; Wiedenhoef *et al.* 2009) e algumas espécies da seção *Cyclostigma* (especialmente *Croton lechleri* Müll. Arg.) são popularmente conhecidas como “sangre de drago” (Dragon’s blood) por exsudarem um látex vermelho da casca, o qual é amplamente utilizado na medicina popular na cura de ferimentos, úlceras estomacais, diarreia, herpes e dermatites proveniente da picada de insetos (Ubillas *et al.* 1994; Jones 2003; Riina *et al.* 2009).

Nectários florais (NF) e nectários extraflorais (NEF’s) são estruturas secretoras comuns em *Croton* (Metcalf & Chalk 1950; Fahn 1979; Elias 1983; Freitas *et al.* 2001)

podendo, em algumas espécies, serem observados nectários pós-florais (Freitas *et al.* 2001), um terceiro tipo de nectário no qual a produção de néctar tem início após a antese e durante o desenvolvimento do fruto (Faegri & van der Pijl 1979; Keeler 1981; Gracie 1991).

Tricomas secretores (Webster 1996) e idioblastos contendo material lipofílico foram relatados em algumas espécies do gênero (Froembling 1896; Metcalfe & Chalk 1950; Webster *et al.* 1996; Sá-Haiad *et al.* 2009).

A presença, posição e o tipo de estruturas secretoras presentes são características utilizadas com sucesso como subsídio para as análises filogenéticas (Dickson 2000; Thadeo *et al.* 2008; Delgado *et al.* 2009; Lopes *et al.* 2009; Sá-Haiad *et al.* 2009; Araújo *et al.* 2010; Coutinho *et al.* 2010; De-Paula *et al.* 2010). A presença, a posição e a composição química do exsudado das estruturas secretoras são características relevantes para a taxonomia e a filogenia de *Croton* (Jose & Inamdar 1989; Caruzo *et al.* 2011). Os nectários florais presentes em *Croton* e em outros gêneros de Crotonoideae constituem-se num caráter diagnóstico para esta subfamília (De-Paula *et al.* 2010). Os nectários florais são vascularizados nas espécies de *Croton* e não vascularizados nas do gênero *Astraea*, o que corrobora a recente segregação destes gêneros (De-Paula *et al.* 2010), como havia sido sugerido pela filogenia molecular (Berry *et al.* 2005).

Estudos de filogenia molecular demonstraram que a seção *Cleodora sensu* Webster (1993) não é monofilética (Caruzo *et al.* 2011). Na análise molecular, a composição desta seção foi alterada, com a inclusão de algumas espécies anteriormente circunscritas em outras seções (Webster 1993) como por exemplo: *Croton fragrans* Kunth. (anteriormente na seção *Lasiogyne*) e *C. organensis* Baill. e *C. rottlerifolius* Baill. (anteriormente na seção *Cyclostigma*). Nesta nova delimitação a seção *Cleodora* é monofilética (Caruzo *et al.* 2011), sendo organizada em duas subseções, *Sphaerogyni* e *Spruceani*.

De acordo com a filogenia molecular algumas seções do subgênero *Geiseleria*, como *Lamprocroton*, *Geiseleria* e *Cuneati* correspondem ao grupo irmão de *Cleodora* (Caruzo *et al.* 2011). A seção *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax in Engler & Prantl. tem distribuição restrita à América do Sul (Van Ee & Berry 2011) e é bem representada nos complexos rupestres de altitude do Brasil (Lima & Pirani 2008). A primeira filogenia molecular de *Croton* (Berry *et al.* 2005) demonstrou que *Lamprocroton sensu* Webster (1993) não é monofilética. Existem duas delimitações distintas para esta seção, uma

delas é baseada em dados morfológicos (Lima & Pirani 2008) e a outra considera dados moleculares (Van Ee & Berry 2011) e divide *Lamprocroton* em duas subseções, *Lamprocroton* e *Argentini*.

A distribuição e o tipo de estruturas secretoras presentes nas espécies de *Croton* podem representar características importantes para elucidar a história evolutiva do gênero e de seus taxa infragenéricos.

O presente trabalho objetivou realizar um estudo anatômico das folhas de espécies das seções *Cleodora* e *Lamprocroton*, bem como de grupos externos relacionados a estas seções (incluindo *Brasiliocroton* e *Astraea*, gêneros próximos de *Croton*), visando conhecer a diversidade de estruturas secretoras nestas espécies. Estes dados servirão de base para trabalhos futuros que contemplem a reconstrução de estados ancestrais destes caracteres estruturais na filogenia molecular dos grupos estudados, buscando elucidar a história evolutiva das estruturas secretoras em *Croton* e contribuir com o esclarecimento das relações entre as espécies do gênero.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies Seleccionadas

Foram analisadas 30 espécies conforme sumarizado na Tabela 1 e apêndice I. Foram avaliadas 28 espécies de *Croton*, incluindo 12 espécies da seção *Cleodora* (sendo 7 da subseção *Sphaerogyni* e 5 da subseção *Spruceani*) e 11 espécies da seção *Lamprocroton*. Para compor o grupo externo foram selecionadas *C. burchellii* Müll. Arg. (seção *Pedicellati*), *C. cuneatus* Klotzsch (seção *Cuneati*), *C. gnaphalii* Baill. (subseção *Argentini* da seção *Lamprocroton*), *C. palanostigma* Klotzsch (seção *Luntia*), *C. sacaquinha* Croizat (seção *Lasiogyne*), *Astraea lobata* (L.) Klotzsch e *Brasiliocroton mamoninha* P.E. Berry & I. Cordeiro.

Da seção *Cleodora sensu* Caruzo *et al.* (2011) não foi possível obter apenas as amostras de *Croton fragrantulus* Croizat., *C. hoffmannii* Müll. Arg., e *C. pseudofragrans* Croizat., *C. rufolepidotus* Caruzo & Riina, *C. sexmetralis* Croizat e *C. stellatoferrugineus* Caruzo & Cordeiro) em expedições de campo e nos herbários nacionais e internacionais consultados (apêndice I).

Para a seleção das espécies da seção *Lamprocroton* foi considerada a circunscrição proposta por Lima & Pirani (2008), tendo sido escolhidas aquelas que ocorrem nos complexos rupestres de altitude do Brasil, em cotas acima dos 1.000 m de

altitude, que correspondem às espécies circunscritas na subseção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011).

Croton gnaphalli foi utilizada como grupo externo, uma vez que está circunscrita na subseção *Argentini* (seção *Lamprocroton sensu* Van Ee & Berry 2011). As demais espécies que compõem o grupo externo foram selecionadas por pertencerem a seções próximas a *Cleodora* e a *Lamprocroton*, além de terem sido selecionadas *Astraea lobata* e *Brasiliocroton mamoinha*, espécies de gêneros próximos a *Croton* e que têm sido utilizadas como grupo externo na maioria das análises de filogenia molecular do gênero (Berry *et al.* 2005; Van Ee *et al.* 2006; Riina *et al.* 2009; Riina *et al.* 2010; Caruzo *et al.* 2011; Van Ee *et al.* 2011).

Croton alabamensis E.A. Smith ex Chapman foi selecionada por já ter sido incluída na seção *Lamprocroton* em estudos de filogenia molecular (Berry *et al.* 2005), entretanto atualmente compõe a seção *Alabamenses* que é monotípica (Van Ee *et al.* 2011), apresentando duas variedades *C. alabamensis* var. *alabamensis* e *C. alabamensis* var. *texensis*, ambas endêmicas do Sul dos Estados Unidos.

As siglas dos herbários seguem o “*Index Herbariorum* – Part I: the Herbaria of the World”² (Thiers, continuously updated), a única exceção é válida para o herbário HUEMG, cujo registro não foi encontrado no *Index Herbariorum*, pertencente à Universidade do Estado de Minas Gerais, *campus* de Carangola, Minas Gerais, Brasil.

Seleção das amostras

Das espécies foram obtidas amostras das folhas em diferentes estádios de desenvolvimento (primórdios foliares, folhas jovens e completamente expandidas). Foram seccionadas as porções apical, médio e basal da lâmina foliar (incluindo a nervura central, a margem e a região entre a margem e a nervura central) e as porções basal e apical do pecíolo. Foram obtidas amostras das folhas em expedições de campo no Brasil ou provenientes de material herborizado (apêndice I). Os materiais coletados foram depositados no herbário VIC.

Microscopia de Luz

Amostras do ápice caulinar, regiões de entrenó próximas ao meristema apical e folhas completamente expandidas (lâmina e pecíolo) foram processadas no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

As amostras obtidas a partir das exsicatas foram submetidas à reversão da herborização (Smith & Smith 1942), desidratadas em série etílica, estocadas em etanol

70% e posteriormente incluídas em metacrilato para obtenção de cortes (Meira & Martins 2003).

Amostras provenientes de coletas em campo foram fixadas em FAA (ácido acético glacial, formaldeído, etanol 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen 1940) ou FNT (formalina neutra tamponada) para caracterização geral e aplicação de testes histoquímicos (Clark 1973). Todo material foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação (48 horas) e estocado em etanol 70%. Parte das amostras foi desidratada em série etílica e incluída em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, preparado conforme instruções do fabricante). As amostras foram seccionadas no plano transversal e longitudinal (5 µm de espessura), em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.) com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981).

Análises dos Caracteres de Superfície

Folhas inteiras foram diafanizadas utilizando-se solução de hidróxido de sódio 10% e hipoclorito de sódio 20%, intercaladas por sucessivas lavagens em água destilada (Johansen 1940, modificado). Os materiais foram corados com safranina (1% solução alcoólica) e montados em gelatina glicerinada.

Histoquímica

Cortes obtidos a mão livre a partir de amostras frescas ou fixadas foram submetidos ao Negro de Sudão B, ao Sudan IV (Pearse 1980) e ao Vermelho Neutro sob fluorescência (Kirk 1970) para detecção de lipídeos totais; ao Sulfato Azul do Nilo para detecção de lipídeos ácidos e neutros (Cain 1947). Para identificação da presença de terpenóides os cortes foram submetidos à reação ao Reagente de Nadi para detecção de óleos essenciais e óleo-resina (David & Carde 1964). Os cortes obtidos de amostras incluídas em historesina foram submetidos ao PAS para identificação de polissacarídeos neutros (McManus 1948).

Todas as observações e a documentação fotográfica foram realizadas em microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical) equipado com sistema de captura de imagens. Para a observação sob luz fluorescente, foi utilizado o filtro UV.

Os coléteres foram classificados de acordo com a descrição proposta por Lersten (1974).

RESULTADOS

Foram identificados cinco tipos de estruturas secretoras com distribuição e morfologia variadas (Tabela 1): laticíferos (Figs 1 a 5), coléteres (Figs. 6 a 20), nectários extraflorais - NEF's (Figs. 21 a 33), idioblastos secretores (Figs. 34 a 40) e tricomas secretores (Figs. 39 e 41 a 44).

A Tabela 1 compreende uma listagem das espécies estudadas e sumariza o tipo de estrutura secretora e sua posição nas folhas de cada uma das espécies.

Espécie		Estruturas Secretoras				Tricomas Secretores	
		Tipo de Laticíferos	Posição de Coléteres	Tipo de NEF's	Posição de Idioblastos Secretores		
Seção Lamprocroton (Subseção Lamprocroton)	<i>C. ceanothifolius</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA	(+)	
	<i>C. dichrous</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA + base coléter	(+)	
	<i>C. erythroxyloides</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA + base coléter	(+)	
	<i>C. imbricatus</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ADA/ABA	(-)	
	<i>C. muellerianus</i>	articulados não ramificados	(-)	(-)	ADA	(+)	
	<i>C. myrianthus</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA	(+)	
	<i>C. pallidulus</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA + base coléter	(+)	
	<i>C. pseudoadipatus</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA + base coléter	(+)	
	<i>C. Pygmaeus</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	(-)	(+)	
	<i>C. splendidus</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	(-)	(+)	
Seção Cleodora Subseção <i>Sphaerogyni</i>	<i>C. cajucara</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ADA/ABA	(-)	
	<i>C. campanulatus</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ADA/ABA	(-)	
	<i>C. hemiargyreus</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
	<i>C. heterocalyx</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
	<i>C. organensis</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ADA/ABA	(-)	
	<i>C. salutaris</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
	<i>C. sphaerogynus</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ADA/ABA + base coléter	(-)	
	Subseção <i>Spruceani</i>	<i>C. billbergianus</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)
		<i>C. fragrans</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)
		<i>C. orinocensis</i>	articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)
<i>C. rottlerifolius</i>		articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
<i>C. spruceanus</i>		articulados ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
Grupo Externo	<i>C. alabamensis</i>	(-) células parenquimatosas de conteúdo denso presentes	baselaminares/acropeciolares	(-)	(-)	(+)	
	<i>C. palanostigma</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
	<i>C. sacaquinha</i>	articulados não ramificados	marginais	(-)	ADA	(+)	
	<i>C. burchellii</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares	ABA	(-)	
	<i>C. cuneatus</i>	articulados não ramificados	marginais	baselaminares/acropeciolares marginais	ABA	(-)	
	<i>C. gnaphalii</i>	articulados não ramificados	(-)	(-)	ADA	(+)	
	<i>Astraea lobata</i>	articulados ramificados	marginais baselaminares acropeciolares basepeciolares	(-)	ADA + base coléter	(-)	
	<i>Brasiliocroton mamoinha</i>	articulados não ramificados	marginais superfície ADA	baselaminares/acropeciolares	ABA + base tricomas tectores	(-)	

Laticíferos – Laticíferos foram observados em todas as espécies das seções *Cleodora* e *Lamprocroton*, bem como nas espécies do grupo externo (Tabela 1). Os laticíferos ocorrem associados aos feixes vasculares, tendo sido observados nos caules (meristema apical caulinar) e folhas analisadas (Figs. 1 a 5). São abundantes inclusive nos feixes que se ramificam para os nectários extraflorais (Figs. 28 e 29) e podem acompanhar a vascularização em alguns coléteres (Fig. 15).

Croton alabamensis foi a única espécie analisada em que não foi observada a presença de laticíferos, porém foram observadas células parenquimáticas com conteúdo denso próximas ao floema, região coincidente com a de ocorrência dos laticíferos.

Em todas as espécies estudadas, os laticíferos se diferenciam muito precocemente, estando completamente formados já nos meristemas apicais caulinares e nos primórdios foliares (Figs. 1 a 5 e 12). São observados junto aos feixes vasculares caulinares e chegam até as folhas e primórdios foliares acompanhando o traço foliar, sempre associados ao floema. As células do laticífero são longas e mantêm-se conectadas por suas paredes terminais (Figs. 2 e 5), formando laticíferos articulados (Figs. 1 a 5). As paredes laterais são espessas, enquanto as terminais são delgadas e o látex é intensamente corado em todas as espécies analisadas (Figs 1 a 5).

Embora os laticíferos sejam articulados em todas as espécies, eles podem ou não se ramificar. Na seção *Lamprocroton* os laticíferos articulados são não ramificados (Figs. 1 e 2), enquanto que na seção *Cleodora* são predominantemente ramificados (Figs. 3 a 5), com exceção de *Croton hemiargyreus*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx*. Em todas as espécies do grupo externo os laticíferos são articulados não ramificados, excetuando *Astraea lobata*, a qual possui laticíferos articulados ramificados.

Coléteres - Coléteres foliares (Figs. 11 a 19) ocorrem em todas as espécies de *Cleodora*, em praticamente todas as espécies de *Lamprocroton* (exceto *Croton muellerianus* e *C. gnaphalii*) e nas demais espécies do grupo externo (Tabela 1).

Os coléteres ocorrem predominantemente nas margens das folhas (Figs. 13 e 14), próximo às terminações das nervuras, entretanto variações no posicionamento destas estruturas nas folhas foram notadas. Em *Astraea lobata*, os coléteres ocorrem ao longo da margem, na base da lâmina foliar (baselaminares) e no pecíolo, no ápice (acropeciolares) e na base (basepeciolares). Em *Croton alabamensis*, os coléteres estão restritos à base da lâmina foliar (baselaminares).

Os coléteres observados nas espécies estudadas correspondem ao tipo padrão definido por Lersten (1974), os quais podem ou não ser vascularizados e são constituídos por um pedúnculo curto, um eixo parenquimático formado por células alongadas, de paredes finas e celulósicas, vacuolizadas, algumas contendo drusas e envolto por uma epiderme secretora em paliçada, recoberta por cutícula espessa (Figs. 11, 15 a 19). Em algumas espécies de *Croton*, na base do pedúnculo do coléter ocorrem idioblastos secretores (Fig. 16).

Os coléteres em *Croton* se originam da atividade da protoderme e do meristema fundamental, podendo também haver participação do procâmbio. São observados nos primórdios foliares (Figs. 12 e 20) e folhas jovens, demonstrando um desenvolvimento precoce e assincrônico. Nos ápices caulinares, mesmo na margem dos primeiros primórdios foliares, os coléteres já se encontram completamente formados e ativos (Figs. 11 a 13 e 15 a 20).

A primeira etapa de desenvolvimento do coléter é caracterizada por um conjunto de células iniciais protodérmicas que se destacam por serem mais volumosas, terem citoplasma denso e núcleo esférico evidente. Estas células iniciais rapidamente sofrem uma série de divisões anticlinais, formando uma fileira de células estreitas que se projetam acima do nível da superfície protodérmica (Fig. 6). Concomitantemente, células do meristema fundamental começam a sofrer divisões periclinais originando um pequeno pedúnculo, o qual possibilita a elevação da estrutura (Figs. 6 a 8). Nesta etapa, o coléter pode ser reconhecido pelo formato globular. Tricomas tectores em formação ou já completamente maduros comumente ocorrem adjacentes à estes coléteres em desenvolvimento (Figs. 6 e 9). A etapa seguinte é caracterizada pela continuidade de divisões e pela expansão das células do coléter (Figs. 9 e 10). Ao final do processo, a protoderme dará origem à epiderme do coléter, região secretora em paliçada e porção que recobre o pedúnculo. O meristema fundamental forma a parte interna do pedúnculo e as células parenquimáticas do eixo central (Figs. 10 e 11). Durante o alongamento celular, observa-se o desenvolvimento de idioblastos contendo drusas na região do parênquima central (Figs. 11, 12 e 15 a 18). Em algumas espécies foi observada vascularização chegando até a base do eixo central (Fig. 16). Laticíferos podem ser visualizados acompanhando a vascularização, como em *Croton ceanothifolius* (Fig. 15).

A secreção produzida pela epiderme secretora é acumulada no espaço subcuticular, como consequência a cutícula se distende (Figs. 11 e 17) e a secreção é eliminada para o meio externo mediante o rompimento da mesma. Após eliminação,

toda a secreção fica retida na porção meristemática apical caulinar, onde os primórdios foliares estão em constante desenvolvimento (Fig. 20). A atividade é mais intensa nos primórdios foliares e folhas jovens, onde a secreção acumulada no espaço subcuticular foi mais comumente observada (Figs. 11 e 17). Testes histoquímicos confirmaram a natureza polissacarídica da secreção dos coléteres, evidenciada pela reação positiva ao PAS (Figs. 18 a 20).

Em algumas espécies os coléteres são caducos, sendo observados somente nos primórdios e folhas jovens, como nos casos de *Croton pygmaeus*, *C. burchelli* e *Brasiliocroton mamoinha*.

Nectários Extraflorais (NEF's) – Um par de NEF's posicionados na inserção do pecíolo com a base da lâmina foliar, denominados como acropéciolares/baselaminares, constitui um caráter diagnóstico de *Cleodora*, estando presente em todas as espécies desta seção (Figs. 21 a 23). A ausência deste tipo de nectário é uma característica da seção *Lamprocroton*, sendo que a única espécie desta seção que apresenta esta estrutura é *Croton imbricatus*. Dentre as espécies do grupo externo, NEF's estão presentes em *Croton cuneatus*, *C. yavitensis*, *C. palanostigma* e *Brasiliocroton mamoinha* (Tabela 1).

Na seção *Cleodora*, em *Croton orinocensis* (subseção *Spruceani*), além de um par na posição acropéciolar/baselaminar ocorrem NEF's ao longo da margem da lâmina foliar, alternados com os coléteres. *Croton fragrans* (subseção *Spruceani*) é a única espécie de *Cleodora* que possui mais de um par de NEF's acropéciolares/baselaminares.

A morfologia dos NEF's é variável entre as espécies da seção *Cleodora* (resultados sumarizados na tabela 2), podendo apresentar um pedúnculo longo (Figs. 24 e 25), com comprimento superior a três vezes a altura da região secretora, curto (Figs. 26 e 27), com comprimento inferior a três vezes a altura da região secretora ou sésil (Fig. 22). A porção secretora localiza-se na região distal do pedúnculo, podendo apresentar uma superfície côncava (Fig. 28) ou convexa (Fig. 29).

Os NEF's são intensamente vascularizados por ramificações provenientes do sistema vascular do pecíolo (Figs. 21 e 27), chegando xilema e floema (em maior proporção) até o parênquima nectarífero que ocupa posição subepidérmica. Os laticíferos acompanham a vascularização dos NEFs (Figs. 28 a 30) e nas terminações de xilema e floema se concentram idioblastos contendo cristais do tipo drusa embora estes também possam ocorrer no tecido fundamental do pedúnculo (Figs. 28 a 32). O

parênquima nectarífero é composto por uma a cinco camadas de células de paredes finas e citoplasma denso (Figs. 28 a 32). A superfície secretora do NEF é dilatada e formada por epiderme secretora em paliçada, com cutícula espessa (Figs. 28 e 29), e na margem possuem paredes espessas. O centro da superfície secretora é o sítio de eliminação do néctar onde as células epidérmicas possuem paredes mais finas e é comum a formação de espaços subcuticulares repletos de secreção (Figs. 29 a 32). O néctar é eliminado pelo rompimento da cutícula (Fig 33).

Ao longo da epiderme nas margens do NEF e do pedúnculo ocorrem tricomas tectores e idioblastos secretores.

Tabela 2. Classificação do tipo de NEF encontrado em cada espécie

Espécie	Comprimento do pedúnculo	Superfície secretora
<i>Croton rottlerifolius</i>	curto	convexa
<i>Croton orinocensis</i>	curto	convexa
<i>Croton spruceanus</i>	curto	convexa
<i>Croton billbergianus</i>	curto	convexa
<i>Croton fragrans</i>	longo	côncava
<i>Croton heterocalyx</i>	curto	convexa
<i>Croton sphaerogynus</i>	curto	convexa
<i>Croton cajucara</i>	séssil	convexa
<i>Croton organensis</i>	curto	convexa
<i>Croton salutaris</i>	longo	côncava
<i>Croton campanulatus</i>	longo	côncava
<i>Croton hemiargyreus</i>	longo	côncava
<i>Croton imbricatus</i>	séssil	convexa
<i>Croton cuneatus</i>	séssil	convexa
<i>Croton palanostigma</i>	curto	Reta/convexa com a margem elevada
<i>Croton burchellii</i>	séssil	convexa
<i>Brasiliocroton mamoninha</i>	curto	convexa

Idioblastos Secretores – Os idioblastos secretores aparecem como células volumosas na epiderme (Figs. 34, 35, 39 e 40) ou por entre as células do parênquima paliçádico (Fig. 37) e/ou do parênquima lacunoso (Figs. 36 e 38) podendo se projetar até a superfície foliar (Figs. 34, 35, 37, 39 e 40) ou mesmo acima dela (Fig. 38). A secreção é densa e ocupa praticamente todo o citoplasma (Figs. 36, 37 e 40). Em algumas espécies, os idioblastos são tão amplos que se estendem no mesofilo de uma face a outra da folha.

Nos cortes dos meristemas apicais avaliados não foram observadas células da protoderme dando origem aos idioblastos secretores. O desenvolvimento destas

estruturas é muito rápido, não sendo possível determinar se são originadas exclusivamente do meristema fundamental ou se há participação da protoderme.

Os idioblastos secretores são comuns nas espécies de *Croton*, mas variam quanto à posição em que ocorrem. Nas espécies da seção *Cleodora*, eles podem estar voltados para ambas as faces da lâmina foliar ou apenas para a face abaxial (Figs. 36 e 38). No mesofilo das espécies da subseção *Spruceani* os idioblastos estão somente voltados para a face abaxial (Fig. 38), enquanto na subseção *Sphaerogyni* o posicionamento é variável (Tabela 1). Na seção *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* estas estruturas não estão presentes apenas em *Croton splendidus* e em *C. pygmaeus* e ocorrem somente voltadas para a face adaxial das folhas (Fig. 39 e Tabela 1), com exceção de *C. imbricatus*, na qual os idioblastos secretores estão voltados para ambas as faces (Fig. 37). Todas as espécies do grupo externo possuem idioblastos secretores, os quais ocorrem voltados para a face adaxial em *Astraea lobata*, *Croton sacaquinha* e *C. gnaphalii*, e voltados para a face abaxial em *Brasiliocroton mamoninha*, *C. palanostigma* e *C. cuneatus* (Tabela 1). *Brasiliocroton mamoninha* apresenta ainda um posicionamento raro de idioblastos secretores ocorrendo, aos pares, na base dos tricomas tectores.

Os testes histoquímicos indicam que a secreção contida nos idioblastos possui natureza lipídica (Fig. 40).

Tricomas Secretores – Os tricomas secretores são unicelulares, constituídos por uma porção basal estreita formando um pequeno pedúnculo e uma porção distal dilatada onde a secreção se acumula (Figs. 39, 41, 43 e 44).

Os testes histoquímicos indicam que a secreção é constituída por lipídios e terpenóides. A natureza lipídica foi evidenciada pela reação positiva ao Sudan IV, Sudan Red e Sulfato Azul do Nilo sob luz visível e ao vermelho neutro sob luz UV. A reação positiva ao teste com o reagente de Nadi exibiu a coloração azul arroxeada típica de óleo-resina.

A célula da protoderme que dá origem ao tricoma secretor é reconhecida pelo maior volume, núcleo evidente e citoplasma denso (Fig. 42). A porção externa desta célula se dilata e se expande. Como consequência da expansão do protoplasto, que é bastante denso, o núcleo fica deslocado para a porção basal (Fig. 43). Na porção distal a secreção produzida é acumulada (Figs. 41 e 44).

Os tricomas têm atividade mais intensa nas folhas mais jovens, do primeiro ao terceiro nó, e na medida em que as folhas se desenvolvem, esses tricomas se tornam senescentes.

Tricomas secretores são restritos às espécies da seção *Lamprocroton* (com exceção de *C. imbricatus*) e à *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*, grupo externo). Em *Cleodora* e demais espécies do grupo externo ocorrem idioblastos secretores voltados para a face abaxial das folhas e os tricomas secretores são ausentes. Tricomas secretores e idioblastos secretores voltados para a face abaxial são estruturas mutuamente excludentes. Espécies da subseção *Spruceani* (seção *Cleodora*) mostram estruturas intermediárias entre idioblastos secretores e tricomas secretores, pois a estrutura que contém a secreção se estende desde o mesofilo e ultrapassa o nível da epiderme (Fig. 38).

DISCUSSÃO

Laticíferos – Laticíferos articulados foram observados em todas as espécies estudadas (exceto *Croton alabamensis*), evidenciando que a presença de látex é um caráter diagnóstico para o gênero *Croton* e uma simplesiomorfia compartilhada entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*.

Euphorbiaceae foi organizada por Webster (1975, 1994) em 5 subfamílias (Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Oldfieldioideae e Phyllantoideae), sendo um dos principais caracteres utilizados para esta delimitação a presença e o tipo de laticíferos. Em estudo filogenético posterior, Oldfieldioideae e Phyllantoideae foram excluídas de Euphorbiaceae (Chase *et al.* 2002). Atualmente, Euphorbiaceae s.s possui 3 subfamílias: Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae (Chase *et al.* 2002). Crotonoideae e Euphorbioideae são latecentes, enquanto laticíferos foram registrados apenas para *Omphalea* e *Macaranga* em Acalyphoideae (Rudall 1994).

Em Euphorbiaceae foram registrados dois tipos de laticíferos. Os não articulados são os mais comuns, observados em *Euphorbia* e na maioria dos demais gêneros da família, tendo sido relatados (Rudall 1994) também em *Astraea comosa* e em 11 espécies de *Croton* (*C. antisiphyliticus* Mart. ex Müll. Arg., *C. conduplicatus* Kunth., *C. heteropleurus* Urb., *C. megalobotrys* Müll. Arg., *C. occidentalis* Müll. Arg., *C. sagreanus* Müll. Arg., *C. sylvaticus* Hochst., *Croton* sp1, *Croton* sp2, *Croton* sp3 e *Croton* sp4.). A presença de laticíferos intrusivos nos raios em caules foram registrados como um caráter exclusivo das espécies de *Croton* da seção *Cyclostigma* (Wiedenhoeft

et al. 2009), os autores sugerem que estes laticíferos dos raios sejam do tipo não articulado.

A presença de laticíferos articulados é relatada em apenas alguns representantes de Crotonoideae, como *Manihot* e *Hevea* (Rudall 1994) e o registro deste tipo de laticíferos é inédito para *Croton* (28 espécies), *Brasilicroton* e *Astraea*, o que reforça a presença de laticíferos articulados nos membros desta subfamília. Laticíferos articulados se constituem numa característica plesiomórfica em *Croton*.

Laticíferos não articulados correspondem ao tipo mais comum em eudicotiledôneas e, para a família Euphorbiaceae, foi sugerido que os laticíferos articulados evoluíram dos não articulados (Rudall 1994). Se esta hipótese for verdadeira, é possível afirmar que em Crotonoideae os laticíferos articulados evoluíram novamente, uma vez que a presença deste tipo de laticífero é um caráter compartilhado por espécies de *Croton*, *Brasilicroton*, *Astraea* e espécies da tribo Galphimeae (Malpighiaceae). Uma segunda hipótese é que os laticíferos articulados sejam o tipo plesiomórfico tanto em Euphorbiaceae quanto em Malpighiaceae. Estas duas famílias são apontadas como apresentando um ancestral latescente comum (Vega *et al* 2002). Uma evidencia que pode sustentar tal hipótese é a presença de laticíferos articulados que na maturidade sofrem dissolução das paredes terminais, em *Mandevilla atrovioleaceae*, Apocynaceae (Lopes *et al* 2009). Por outro lado, laticíferos articulados podem ser considerados como um caráter homoplástico, tendo evoluído de forma independente em linhagens não diretamente relacionadas como em espécies de *Croton* e da tribo Galphimeae.

Quanto a origem dos laticíferos (tanto articulados como não articulados) acredita-se que tais estruturas tenham surgido independentemente de células parenquimáticas que passam a secretar látex (Scott 1886, *apud* Rudall 1994). No presente trabalho, as células parenquimáticas com conteúdo heterogêneo nas proximidades do floema de *Croton alabamensis* indicam uma condição ancestral da célula que deu origem aos laticíferos em *Croton*. Esta evidencia corrobora a filogenia molecular, pois *C. alabamensis* foi inicialmente circunscrita em *Lamprocroton* (Webster 1993), entretanto tal posicionamento não foi suportado pela filogenia molecular (Van Ee *et al.* 2011). Uma nova seção, *Alabamenses*, monotípica, foi proposta para incluir esta espécie, a qual ocupa uma posição mais basal dentro de *Croton* (subgênero *Quadrilobi*), ficando distante de *Lamprocroton* (subgênero *Geiseleria*).

Ainda não está claro como o tipo de laticífero (articulados ou não articulados) pode auxiliar a compreensão das relações filogenéticas em Euphorbiaceae e mesmo em *Croton*. Entretanto, no presente trabalho foi possível identificar em nível subgenérico algumas tendências quanto a ocorrência de laticíferos ramificados e não ramificados. Na subseção *Lamprocroton* os laticíferos articulados são exclusivamente não ramificados, enquanto que na seção *Cleodora* o tipo predominante é o articulado ramificado, com exceção apenas para *C. hemiargyreus*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* onde os laticíferos articulados são não ramificados. Entretanto, para se definir o tipo plesiomórfico para o gênero são necessários estudos que considerem um maior número de espécies e de seções de *Croton*, uma vez que, no grupo externo, *Astraea lobata* possui laticíferos articulados ramificados e *Brasiliocroton mamoninha*, *Croton burchelli*, *C. cuneatus*, *C. gnaphalli*, *C. palanostigma* e *C. sacaquinha* possuem laticíferos articulados não ramificados. Desta forma, a reconstrução dos caracteres anatômicos (neste caso o tipo de laticífero) usando filogenias moleculares se fazem necessários para esclarecer a história evolutiva dos mesmos em *Croton*.

Coléteres

Os coléteres nas espécies estudadas de *Croton* são considerados como emergências por apresentarem uma origem mista a partir da protoderme e do meristema fundamental, havendo a participação do procâmbio naqueles que são vascularizados. Os coléteres encontram-se ativos nos primórdios foliares e em folhas jovens, onde eliminam uma secreção de natureza polissacarídica. O que esta de acordo com o relatado na literatura para a função de proteção dos primórdios foliares durante o seu desenvolvimento atribuída a essas estruturas (Lersten & Horner 1968; Lersten 1974; Fahn 1979), promovendo a lubrificação da região meristemática apical caular de forma a amenizar o atrito dos tecidos foliares em formação e evitar a sua dessecação (Solereder 1908). A função dos laticíferos observados nos coléteres de *C. ceanothifolius* é ainda obscura. O látex pode conter substâncias fonte para a pré-secreção, especialmente em coléteres que secretam resinas (Thomas 1991).

A secreção eliminada pelas células epidérmicas secretoras em paliçada acumula-se num espaço subcuticular. O constante acúmulo da secreção neste espaço pressiona a cutícula, a qual vai se dilatando até a sua ruptura e consequente extravasamento da secreção para o meio externo, envolvendo os primórdios foliares e as folhas jovens. Este processo secretor já foi relatado para coléteres de distintas famílias dentre as

Angiospermas (Lersten & Curtis 1974; Mohan & Inamdar 1986; Kuriachen & Dave 1989; Paiva & Machado 2006; Paiva 2012). Segundo Thomas (1991) a formação deste espaço onde a secreção se acumula acelera o processo de eliminação da mesma.

Dentro da ordem Malpighiales (APGII 2003), a presença de coléteres é relatada em Euphorbiaceae, Erythroxylaceae, Passifloraceae, Rhizophoraceae, Turneraceae (Thomas 1991) e em Caryocaraceae (Paiva & Machado 2006). Em *Caryocar brasiliense* Camb. os coléteres são do tipo padrão e ocorrem na face adaxial das estípulas que protegem o ápice caulinar. Estes são, respectivamente, o tipo e o local de ocorrência mais comuns para os coléteres (Thomas 1991). Em todas as espécies de *Croton* estudadas no presente trabalho os coléteres observados também são do tipo padrão, porém o posicionamento dos mesmos nas margens das folhas é um registro raro. A ocorrência de coléteres nas margens de estípulas em espécies de Rubiaceae já foi relatada (Lersten 1974). Nesta família, as estípulas comumente envolvem os ápices caulinares e contém inúmeros coléteres que protegem os primórdios foliares em desenvolvimento (Lersten 1974; Fahn 1979; Klein *et al.* 2004; Vitarelli & Santos 2009). A presença de coléteres nas margens das folhas é incomum, porém é uma característica importante em *Croton*, pois suas folhas em desenvolvimento apresentam-se dobradas, mantendo as margens de cada metade da lâmina foliar unidas, com apenas a superfície dorsal exposta ao meio externo. Os coléteres encontram-se ao longo dessas margens e sua secreção recobre toda a superfície marginal das folhas em expansão e isolam a superfície ventral do meio externo, protegendo-a contra a dessecação. Isto é particularmente interessante em *Croton*, pois a maioria de suas espécies possuem folhas densamente recoberta por tricomas tectores na face abaxial, os quais protegem esta superfície. Por outro lado, a face adaxial possui uma densidade consideravelmente menor de tricomas tectores, podendo inclusive ser glabra.

A presença de coléteres do tipo padrão em 26 das 28 espécies de *Croton* estudadas, além de ser um dado novo para o gênero, indica que tais estruturas sejam comuns em *Croton*. Verifica-se que a falta de registros sobre a ocorrência de coléteres em *Croton* pode ser devido a problemas de interpretação. Ao analisar as imagens dos cortes anatômicos de flores e folhas de espécies de *Croton* publicadas em periódicos (Freitas *et al.* 2001; Sá-Haiad *et al.* 2009; De-Paula *et al.* 2010) é possível verificar uma grande semelhança estrutural e na posição com os coléteres descritos para as espécies estudadas no presente trabalho. Tais estruturas receberam as denominações: estruturas filamentosas nas flores pistiladas de *Croton floribundus*, *C. fuscescens*, *C. glandulosus*,

C. lundianus, *C. piptocalyx*, *C. triqueter* e *C. urucurana* (De-Paula et al 2010) e nectários extraflorais nas estípulas e na margem das folhas de *C. sarcopetalus* Müll. Arg. (Freitas et al 2001), e nas margens das folhas de espécies de *Croton* seção *Cyclostigma sensu* Webster (1993), de *Brasiliocroton mamoninha* e de *Astraea lobata*, *A. jatropa* (Müll.Arg.) B.W.van Ee e *A. Klotzschii* Didr. (Sá-Haiad et al 2009).

Nectários extraflorais não são incomuns nas margens das folhas de espécies de *Croton*, entretanto esses ocorrem alternados com outras estruturas secretoras de morfologia distinta e de tamanho muito reduzido. Como demonstrado no presente trabalho, para as espécies de *Croton* seções *Cleodora* e *Lamprocroton* e grupo externo, tais estruturas correspondem aos coléteres do tipo padrão. Estes resultados reforçam o relato de Webster (1996) de que, em folhas de *Croton*, as glândulas especializadas na base da lâmina ou ápice do pecíolo, e por vezes presentes entre os dentes ao longo da margem, são diferentes dos pequenos tricomas glandulares marginais, sendo muito maiores e morfologicamente mais complexas, não parecendo ser homólogas aos pequenos tricomas glandulares marginais.

Nas espécies estudadas de *Croton* os NEF's e coléteres são estruturas morfológica e funcionalmente distintas e parecem não ser estruturas homólogas, o que não impede que exista alguma correlação entre a história evolutiva de ambas. Em *Astraea lobata* e em *Croton alabamensis*, que ocupam uma posição basal na filogenia molecular, não ocorrem os NEF's baselaminares, entretanto nesta posição encontram-se aglomerados de coléteres. Este fato indica que pode ter havido uma pressão de seleção em *Croton* para a perda dos coléteres baselaminares, e surgimento de estruturas mais complexas como os NEF's que podem ter proporcionado um maior valor adaptativo para este grupo de espécies. Lersten (1975) observou que alguns gêneros de Rubiaceae perderam a capacidade de produzir coléteres, e correlaciona esta tendência evolutiva com o investimento em outras especializações estruturais ou com um incremento de espécies herbáceas.

Ressalta-se a importância de uma revisão da classificação das estruturas secretoras descritas como nectários extraflorais nos trabalhos de Freitas *et al* (2001) e de Sá-Haiad *et al* (2009) e daquelas descritas como estruturas florais filamentosas por De-Paula *et al* (2010). Freitas *et al* (2001) e Sá-Haiad *et al* (2009) justificaram a classificação como NEF's e não como coléteres pois verificaram a presença de açúcares na composição do secretado. Entretanto, na secreção dos coléteres também podem ocorrer açúcares (Thomas 1991), como a presença de ramnose na secreção dos coléteres

de *Aganosma* (Dave *et al.* 1987), de *Roupelia* (Thomas *et al.* 1989), de *Alstonia* (Thomas & Dave 19906) e de *Ixora* (Dave & Thomas 1991) e glicose e ramnose na secreção dos coléteres de *Allamanda* (Thomas & Dave 1989).

A definição de determinadas estruturas secretoras como tricomas, coléteres, nectários, hidatódios e glândulas de sal pode não ser uma tarefa fácil. Além da morfologia, o tipo de secreção deve ser considerado (Fahn 1979), pois deverá interferir no esclarecimento da função desempenhada pela estrutura. Os resultados do presente trabalho enfatizam a presença de coléteres em *Croton*, uma vez que a morfologia, a posição, o tipo de secreção e o período de atividade dessas estruturas nas espécies estudadas, refletem a função de proteção dos primórdios foliares durante o seu desenvolvimento.

Nas espécies estudadas de *Croton* verificou-se que o período de atividade secretora dos coléteres e dos NEF's é distinto. Estando os coléteres já completamente formados e ativos nos primórdios foliares, enquanto os NEF's, em início de formação nos primórdios foliares, secretam apenas nas folhas completamente expandidas.

Os dados relatados no presente trabalho sugerem que a presença de coléteres seja um caráter diagnóstico para *Croton* e gêneros proximamente relacionados, como *Brasiliocroton* e *Astraea*. O estudo da evolução dos coléteres pode contribuir com a compreensão da história evolutiva das estruturas secretoras em *Croton*, bem como das interações filogenéticas na família Euphorbiaceae. A ausência de coléteres nas folhas de *C. muellerianus* (subseção *Lamprocroton*, Seção *Lamprocroton*) e *C. gnaphalii* (subseção *Argentinii*, Seção *Lamprocroton*) é surpreendente. Acredita-se que coléteres possam ocorrer nestas espécies, porém o diminuto tamanho das folhas (algumas não chegam a 2 cm de comprimento) em *Lamprocroton* e do próprio coléter pode ter dificultado o alcance dos mesmos nos cortes efetuados. Uma alternativa para se confirmar a presença de coléteres nestas espécies é a utilização de cortes seriados compreendendo todo o meristema apical.

A presença de drusas no parênquima do eixo central dos coléteres de todas as espécies estudadas é mais um caráter que pode ter valor taxonômico para *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*.

Nectários Extraflorais (NEF's)

A atividade dos NEF's nas espécies de *Croton* estudadas ocorre em folhas completamente expandidas e pode ser detectada pelo acúmulo do néctar em um espaço

subcuticular e posterior eliminação pelo rompimento da cutícula. Este mecanismo de secreção de néctar por nectários (florais e extraflorais) é comum em espécies de diversas famílias botânicas (Fahn 1952; Thadeo *et al* 2008). A presença marcante de laticíferos acompanhando o floema na vascularização dos NEF's, indica que o látex pode estar contribuindo com o processo de transferência de açúcares do floema para os tecidos nectaríferos. Situação semelhante foi relatada para os NEF's de *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg. (Fahn 1979). A presença dos laticíferos nos NEF's de *Croton* pode indicar ainda, que outros constituintes do látex podem fazer parte da composição do néctar secretado.

A ausência de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes é um caráter diagnóstico para a seção *Lamprocroton*. A presença destes nectários em *Croton imbricatus* é um forte indício de que esta espécie esteja erroneamente posicionada na seção *Lamprocroton*. Cabe ressaltar que esta é uma das espécies que não foram sequenciadas no trabalho de filogenia molecular realizado para a seção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011). Por outro lado, a presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes é um caráter diagnóstico para a seção *Cleodora*. Nesta seção, foi verificada uma íntima relação entre o comprimento do pedúnculo dos NEF's e a morfologia da superfície secretora. Os NEF's que possuem pedúnculo curto ou sésil apresentam a superfície secretora convexa, enquanto naqueles em que o pedúnculo é longo a superfície secretora é côncava. Esta distinção estrutural entre os NEF's em *Cleodora* está diretamente relacionada com a história evolutiva das espécies desta seção. Na subseção *Spruceani* (Caruzo *et al* 2011) os NEF's possuem pedúnculo curto e superfície secretora convexa. *Croton fragrans* é a única exceção, espécie que difere das demais também pela presença de mais de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes. Estes dados anatômicos são congruentes com a topologia das árvores filogenéticas, onde esta espécie se posiciona externamente ao clado constituído pelas demais espécies da subseção *Spruceani* (Caruzo *et al* 2011).

Dentro da subseção *Sphaerogyni*, dois clados distintos são bem suportados pela filogenia molecular (Caruzo *et al* 2011): o clado 1, o qual compreende *C. organensis*, *C. cajucara*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* e o clado 2, com *C. hemiargyreus*, *C. campanulatus* e *C. salutaris*. Considerando a estrutura dos NEF's as espécies compreendidas nestes dois clados apresentaram tendências evolutivas distintas, sendo que as espécies do clado 1 são caracterizadas pela presença de NEF's com pedúnculo curto ou sésil e superfície secretora convexa, assim como as espécies da subseção

Spruceani, enquanto naquelas do clado 2 os NEF's possuem pedúnculo longo e superfície secretora côncava.

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que em *Croton* foram selecionadas distintas estratégias de interações ecológicas de proteção mediadas por animais, em especial formigas carnívoras de comportamento agressivo. Nas espécies em que os NEF's possuem pedúnculo curto e superfície secretora convexa, não ocorre acúmulo de néctar na superfície do NEF, pois à medida que a secreção é eliminada ela escorre e se espalha sobre a lâmina foliar e pecíolo. Assim, a área onde os visitantes podem encontrar o alimento é maior, mas a quantidade de secreção acumulada é menor. Nas espécies em que os NEF's possuem pedúnculo longo e superfície secretora é côncava, o néctar eliminado fica acumulado na concavidade. Desta forma, o recurso disponibilizado ao visitante fica concentrado em um único local. Entretanto, estudos de ecologia da interação entre os NEFs de *Croton* e visitantes são necessários para se avaliar se essas diferenças podem ter significado adaptativo ou são casuais.

Idioblastos Secretores e Tricomas Secretores – A presença de tricomas secretores na face abaxial das folhas é um caráter diagnóstico para a seção *Lamprocroton* (exceto *C. imbricatus*), estando presente também em *Croton sacaquinha* (seção *Lasiogyne*, grupo externo). Webster *et al* (1996) relata que a ocorrência de tricomas secretores é restrita à seção *Barhamia* e à *C. ciliatoglandulifer* (seção *Adenophyllum*, extinta seção monoespecífica *sensu* Webster *et al* 1996), assim a observação de tricomas secretores em *Lamprocroton* e *Lasiogyne* amplia o conhecimento sobre a distribuição destas estruturas em *Croton*, o que é de fundamental importância para a taxonomia e abordagens filogenéticas para o gênero. A seção *Adenophyllum sensu* Webster (1993), que era monoespecífica, foi extinta (Van Ee *et al* 2011), tendo sido criada a seção *Adenophylli*, a qual inclui *C. ciliatoglandulifer* e mais 222 espécies do novo mundo. Futuros trabalhos que ampliem a investigação anatômica nas demais espécies das seções *Adenophylli* e *Lasiogyne* se fazem necessários para que seja possível confirmar se a presença de tricomas secretores se constitui num caráter diagnóstico para estas seções assim como para *Lamprocroton*.

Os resultados obtidos permitem sugerir que os idioblastos secretores e tricomas secretores voltados para a face abaxial das folhas sejam estruturas homólogas em *Croton*. Em algumas espécies de *Croton* (seção *Cleodora* + *C. imbricatus*, *C. burchelli*, *C. cuneatus*, *C. palanostigma*), em *Astraea lobata* e em *Brasiliocroton mamoinha*

foram selecionadas estruturas internas de armazenamento de metabólitos secundários, nos idioblastos secretores do mesofilo. Em outras (seção *Lamprocroton*, exceto *C. imbricatus*, + *C. alabamensis* e *C. sacaquinha*) ocorreu uma tendência a exteriorização das estruturas secretoras que contém esses metabólitos na forma de tricomas secretores. A presença de idioblastos secretores voltados para a superfície abaxial em *Brasiliocroton mamoinha*, espécie irmã de *Croton*, indica que esta é uma característica simplesiomórfica compartilhada entre *Croton* e *Brasiliocroton*. Dentro do gênero *Croton*, parece ter ocorrido uma transferência do local de armazenamento dos metabólitos secundários de estruturas secretoras internas para estruturas secretoras externas. Desta forma, a presença de tricomas secretores parece ser uma sinapomorfia da seção *Lamprocroton sensu* Van Ee & Berry (2011) e possivelmente também das seções *Lasiogyne* (*C. sacaquinha in* Caruzo *et al.* 2011) e *Barhamia*, embora seja necessário avaliar um maior número de espécies nessas seções para confirmar tal hipótese. A presença de tricomas secretores pode ainda ser considerada como um caráter homoplástico por ter sido relatada em *C. ciliatoglandulifer* (sect. *Adenophyllum sensu* Webster 1993, sect. *Adenophylli sensu* Van Ee *et al* 2011).

Em *Cleodora*, as espécies da subseção *Spruceani* parecem representar um grupo chave na compreensão da história evolutiva dos tricomas secretores, pois todas as espécies desta subseção possuem idioblastos secretores voltados para a face abaxial das folhas, os quais apresentam um posicionamento transitório entre estruturas internas (idioblastos secretores) e estruturas externas (tricomas secretores). Desta forma, a subseção *Spruceani* pode ser um clado que ilustra uma etapa de transição na história evolutiva das estruturas secretoras em *Croton*, indicando que os tricomas secretores podem ter se originado a partir da modificação de idioblastos secretores, corroborando a homologia entre estas estruturas. Os testes histoquímicos realizados reforçam a hipótese de homologia, uma vez que demonstram semelhante composição química, do produto secretado, o qual apresenta natureza lipídica tanto nos idioblastos quanto nos tricomas secretores.

Esta hipótese corrobora as conclusões de Thomas (1991) e de Fahn (2002) no que diz respeito à história evolutiva das estruturas secretoras. Thomas (1991) conclui que as estruturas glandulares exógenas possuem uma evolução mais recente e Fahn (2002) sugere que o curso da evolução dos tecidos secretores com função protetora no corpo das plantas vasculares parece ter sido proveniente do mesofilo, como ocorre em algumas Pteridospermas, e assume duas direções: a primeira para a epiderme e tricomas

epidérmicos, como em muitas Angiospermas, e a segunda para o floema primário e secundário, como em algumas coníferas, bem como para o xilema secundário.

CONCLUSÕES

A grande diversidade de estruturas secretoras distribuídas nas folhas das espécies de *Croton* (laticíferos, coléteres, NEF's, idioblastos secretores e tricomas secretores) justificam a riqueza química do gênero e apontam para o potencial em bioprospecção de suas espécies. Além de indicarem que este grupo apresenta um alto nível de interações ecológicas, fato ainda pouco explorado em pesquisas com *Croton*.

As estruturas secretoras em *Croton* mostram grande relevância na taxonomia e filogenia do gênero, tendo sido possível fazer relações entre os clados estudados com grande potencial para o esclarecimento das relações filogenéticas e história evolutiva de suas espécies.

A presença de laticíferos articulados não ramificados é um caráter diagnóstico para as espécies da seção *Lamprocroton*.

Os coléteres marginais são indicados como um provável caráter diagnóstico em *Croton*.

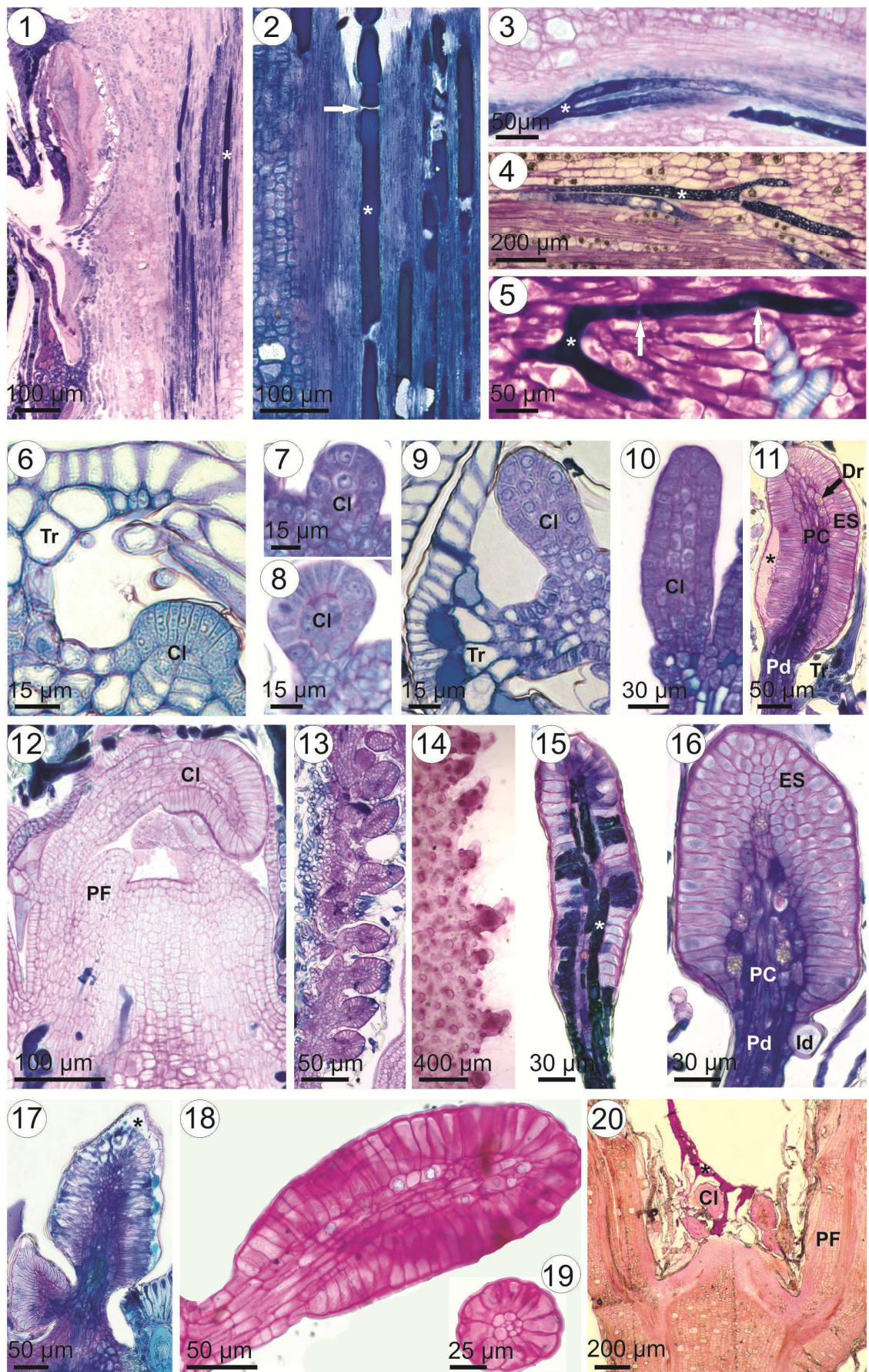
Foi possível estabelecer uma correlação entre a morfologia dos NEF's, os quais apresentam pedúnculo longo e superfície secretora côncava ou pedúnculo curto ou sésil e superfície secretora convexa. Os diferentes tipos de NEF's ilustram tendências evolutivas distintas dentro da seção *Cleodora*, as quais corroboram os clados plotados pela filogenia molecular em suas subseções.

Idioblastos secretores e tricomas secretores parecem ser estruturas homólogas em *Croton*.

Os caracteres anatômicos observados nas folhas de *Croton imbricatus* sugerem que esta espécie não esteja proximamente relacionada com as demais espécies da seção *Lamprocroton*. A presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciulares, a presença de idioblastos secretores voltados para ambas as faces da folha e a ausência de tricomas secretores nesta espécie justificam esta conclusão. Novos estudos moleculares que ampliem a amostragem de *Lamprocroton* e incluam *C. imbricatus* se fazem necessários para uma melhor delimitação desta seção.

O conhecimento acerca da diversidade de estruturas secretoras em *Croton* se constitui numa importante fonte de dados que contribui com o esclarecimento acerca

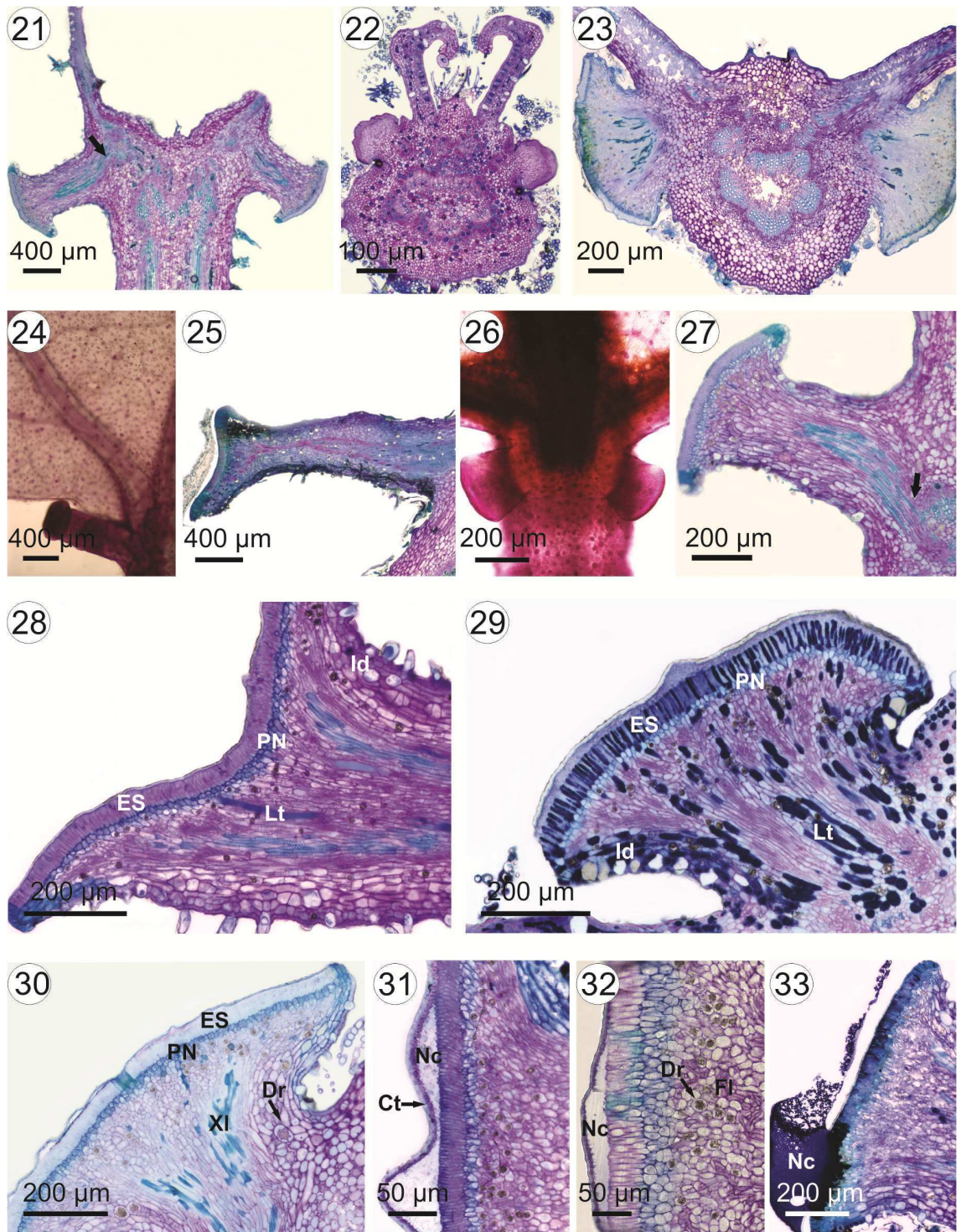
das interrelações entre as espécies do gênero ou mesmo dentro da família Euphorbiaceae. Entretanto, estudos que combinem os dados de anatomia e biologia molecular, assim como estudos de reconstrução ancestral dos caracteres anatômicos usando as filogenias moleculares, são necessários para esclarecer as relações filogenéticas e história evolutiva das estruturas secretoras em *Croton*.

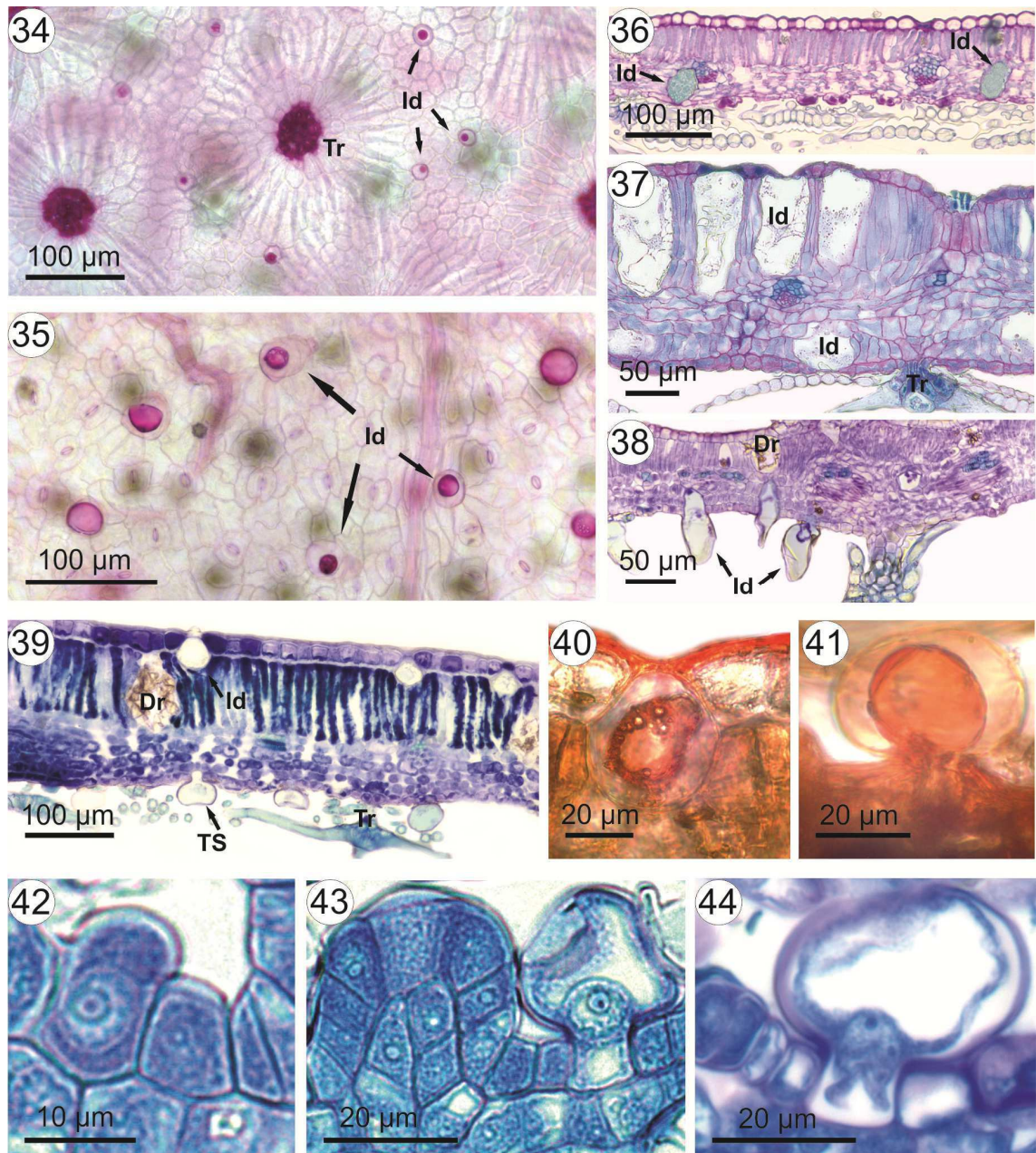


Figuras 1 a 5. Secções longitudinais dos primórdios foliares incluídos em resina e corados com azul de toluidina, mostrando os laticíferos em vista longitudinal. **Fig. 1.** *C. muellerianus*, laticíferos articulados não ramificados. **Fig. 2.** *C. imbricatus*, laticíferos articulados não ramificados. **Fig. 3.** *C. campanulatus*, laticíferos articulados ramificados. **Fig. 4.** *C. rottlerifolius*, laticíferos articulados ramificados. **Fig. 5.** *C. orinocensis*, laticíferos articulados ramificados. **Figuras 6 a 13 e 15 a 17.** Folhas de *Croton* em distintos estádios de desenvolvimento, incluídas em resinas e coradas com azul de toluidina. **Figuras 6 a 11.** Secções transversais de primórdios foliares e folhas jovens mostrando a ontogenia dos coléteres. **Fig. 6.** Primórdio foliar do primeiro nó caulinar de *C. erythroxyloides*, mostrando o início do desenvolvimento do coléter. Observe que é comum a sua localização adjacente aos tricomas lepidotos. **Figs. 7, 8 e 9.** Coléteres em formação nos primórdios foliares do terceiro nó caulinar de *C. erythroxyloides* (Figs. 7 e 8) e de *C. splendidus* (Fig. 9), mostrando o início da formação do parênquima central e pedúnculo a partir de divisões periclinais do meristema fundamental. Observe o núcleo evidente e a intensa taxa de divisões anticlinais da protoderme para a formação da epiderme secretora. **Fig. 10.** *C. erythroxyloides*, coléter em fase final do desenvolvimento. **Fig. 11.** *C. pallidulus*, coléter completamente formado e ativo, observe a secreção acumulada no espaço subcuticular. **Fig. 12.** Coléter completamente formado associado aos primeiros primórdios foliares de *C. campanulatus*. **Fig. 13.** Coléteres marginais nos primórdios foliares de *C. cajucara*. **Fig. 14.** Coléteres marginais em folhas completamente expandidas diafanizadas de *C. heterocalyx*. **Fig. 15.** Coléter marginal vascularizado em *C. ceanothifolius*, estruturas coradas intensamente no parênquima central correspondem aos laticíferos. **Fig. 16.** Coléter marginal de *C. pallidulus*, evidenciando a vascularização chegando até a base do parênquima central e a presença de idioblastos secretores na base da estrutura. **Fig. 17.** Coléteres ativos nos primórdios foliares de *C. imbricatus*. **Figs. 18 e 19.** Reação positiva ao PAS nos coléteres dos primórdios foliares de *C. erythroxyloides* em secção longitudinal (Fig. 18) e transversal (Fig. 19). **Fig. 20.** Secção longitudinal do ápice caulinar de *C. imbricatus*, evidenciando reação positiva ao PAS da secreção proveniente dos coléteres envolvendo os primórdios foliares.

Asteriscos brancos. Laticíferos. **Asteriscos negros.** Secreção do coléter. **Setas brancas.** Paredes terminais dos laticíferos. **Cl.** Coléter. **Dr.** Drusa. **ES.** Epiderme secretora em paliçada. **Id.** Idioblasto secretor. **PC.** Parênquima central. **Pd.** Pedúnculo. **PF.** Primórdio foliar. **Tr.** Tricoma tector.

Figuras 21 a 33: NEF's baselaminares acropetiolares em secção longitudinal. **Figs. 21 a 23, 25, 27 a 33.** Inclusão em resina, corado com azul de toluidina. **Figs 24 e 26.** Folhas diafanizadas coradas com fucsina alcólica. **Fig. 21.** *Croton heterocalyx*, par de NEF's com pedúnculo curto. Note a vascularização proveniente da ramificação de feixes vasculares do pecíolo (seta - idem Fig. 27). **Fig. 22.** *C. cajucara*, par de NEF's sésseis. **Fig. 23.** *C. spruceanus*, par de NEF's com pedúnculo curto. **Fig. 24.** *C. hemiargyreus*, NEF com pedúnculo longo. **Fig. 25.** *C. salutaris*, NEF com pedúnculo longo e superfície secretora côncava. **Fig. 26.** *Brasiliocroton mamoninha*, NEF com pedúnculo curto. **Fig. 27.** *C. heterocalyx*, NEF com pedúnculo curto e superfície secretora convexa. **Fig. 28.** *C. fragrans*, superfície secretora côncava. Note os laticíferos acompanhando a vascularização do NEF e idioblastos secretores ao longo do pedúnculo (idem Fig. 29). **Fig. 29.** *C. sphaerogynus*, superfície secretora convexa. **Fig. 30.** Vista geral do NEF de *C. spruceanus*; com xilema, floema e laticíferos chegando até o parênquima nectarífero. **Figs. 31 e 32.** Detalhe da superfície secretora dos NEF's de *C. palanostigma* e *C. rottlerifolius* respectivamente, evidenciando a epiderme em paliçada eliminando o néctar que se acumula no espaço subcuticular. **Fig. 33.** Detalhe da superfície secretora do NEF de *C. billbergianus*, evidenciando a eliminação do néctar pelo rompimento da cutícula. **ES.** Epiderme Secretora. **Ct.** Cutícula. **Dr.** Drusa. **Fl.** Floema. **Id.** Idioblasto Secretor. **Lt.** Laticífero. **Nc.** Néctar. **PN.** Parênquima Nectarífero. **Xl.** Xilema.





Figuras 34 e 35. Vista frontal dos idioblastos secretores ao nível das células epidérmicas na face adaxial das folhas de *C. myrianthus* e na face abaxial das folhas de *C. cajucara*. **Figs. 36 a 39.** Secções transversais de folhas incluídas em resina e coradas com azul de toluidina. **Fig. 36.** *C. hemiargyreus*, idioblastos voltados apenas para a face abaxial. **Fig. 37.** *C. imbricatus*, idioblastos voltados para ambas as faces. **Fig. 38.** *C. fragrans*, idioblastos secretores voltados apenas para a face abaxial. Note como emergem do mesofilo ao meio externo, ficando acima do nível das células epidérmicas. Estas estruturas correspondem ao tipo transitório entre idioblastos e tricomas secretores. **Fig. 39.** *C. dichrous*, Idioblastos secretores voltados apenas para a face adaxial com projeções epidérmicas, tricomas secretores na face abaxial. **Figs. 40 e 41.** Secções transversais de folhas submetidas ao teste com Sudan IV, reação positiva dos idioblastos secretores em *C. dichrous* (Fig. 40) e dos tricomas secretores em *C. splendens*. **Figs. 42 a 44.** Ontogenia dos tricomas secretores em *C. splendens* (Figs. 42 e 43) e *C. erythroxyloides* (Fig. 44). **Dr.** Drusa. **Id.** Idioblasto Secretor. **Tr.** Tricoma Tector. **TS.** Tricoma Secretor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG – The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** **141**:399-436.
- Araújo, J.S.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C. & Meira, R.M.S.A. 2010. Leaf anatomy as an additional tool to taxonomy of 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). **Plant Systematic and Evolution** **286**:117-131.
- Berry, P.E.; Hipp, A.L.; Wurdack, K.J.; VanEe, B. & Riina, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** **92**: 1520-1534.
- Burger, W. & Huft, M. 1995. Flora costaricensis: Euphorbiaceae. **Fieldiana** **36**: 1-169.
- Cain, A. J. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. **Quarterly Journal of Microscopical Science** **88**: 383-392.
- Campos, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia** **73**: 116–120.
- Caruzo, M. B. R.; VanEe, B. W.; Cordeiro, I.; Berry, P. E. & Riina, R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in “Sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **60**: 193-206.
- Chase, W.M.; Zmarzty, S., Lledó; M.D., Wurdack; K.J., Swensen; S.M. & Fay, M.F. 2002. When in doubt, put in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin** **57**: 141-181.
- Clark, G. 1973. **Staining procedures**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Costa, A.M.L., Silva, J.C.R., Campos, A.R., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., 1999. Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. **Phytotherapy Research** **13**: 689–691.
- Coutinho, I.A.C.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany** **58**: 224-232.
- Dave, Y., Thomas, V. & Kuriachen, P.M. 1987. Structure and development of colleters in *Aganosoma caryophyllata* G. Don. **Pakistan Journal of Botany** **19**:243-248.
- Dave, Y. & Thomas, V. 1991. Anatomy and histochemistry os stipular colleters in *Ixora coccinera* L. **Journal of Indian Botanical Society** **70**: 51-54.
- David, R.; Carde, J. P. 1964. **Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi**. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences, Paris.

- Delgado, M.N.; Azevedo, A.A.; Valente, G.E. & Kasuya, M.C.M. 2009. Morfo-anatomia comparada de espécies da subtribo *Coutoubeinae* (Chironieae-Gentianaceae). **Acta Botanica Brasilica** **23**: 956-967.
- De-Paula, O.C., Sajo, M.G., Prenner, G. Cordeiro, I & Rudall, P.J. 2010. Morphology , development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae-Malpighiales). **Plant systematic and Evolution** **292**: 1-14.
- Dickison, W.C. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. Academic Press, USA. 533p.
- Elias, T.S. 1983. **Extrafloral nectaries: their structure and distribution**. In: The Biology of Nectaries (B. Bentley and T. Elias, eds), pp. 174–203. New York: Columbia University Press.
- Faegri K, van der Pijl L. 1979. **The principles of pollination ecology**. Pergamon Press, New York.
- Fahn A. 1952. On the structure of floral nectaries. **Botanical Gazette** **113**: 464–470.
- Fahn, A. 1979. **Secretory Tissues in Plants**. Academic Press, London.
- Fahn A. 2002. Functions and location of secretory tissues in plants and their possible evolutionary trends. **Israel Journal of Plant Sciences** **50**: 59–64.
- Fariás, F.R., Williamson, J.S., Rodríguez, S.V., Angeles, G. & Portugal, V.O. 2009. Bark anatomy in *Croton draco* var. *draco* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany** **96**(12): 2155–2167.
- Freitas, L., Bernardello, G., Galetto, L. & Paoli, A.A.S. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **136**: 267–277.
- Govaerts, R.; Frodin, D.G. & Radcliffe-Smith, A. 2000. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. Vol. 2. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Gracie C. 1991. Observation of dual function of nectaries in *Ruellia radicans* (Nees) Lindau (Acanthaceae). **Bulletin of the Torrey Botanical Club** **118**: 188–190.
- Grassi-Kassisse, D.M., Wolf-Nunes, V., Miotto, A.M., Farias-Silva, E., Souza-Brito, A.R.M., Nunes, D.S., Spadari-Bratfisch, R.C., 2003. Sensitivity to b-adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **55**: 253–257.
- Hiruma-Lima, C.A., Spadari-Bratfisch, R.C., Grassi-Kassisse, D.M., Souza-Brito, A.R.M., 1999. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Medicinal** **65**: 325–330.
- Johansen D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York.
- Jones, K. 2003 . Review of Sangre de Drago (*Croton lechleri*) – A South American tree sap in the treatment of diarrhea, inflammation, insect bites, viral infections, and

- wounds: traditional uses to clinical research. **Journal of Alternative and Complementary Medicine** (New York, N.Y.) 9: 877 – 896.
- Jose, T. & Inamdar, J.A. 1989. Structure, ontogeny, and biology of nectaries in *Croton bonplandius* Baill. Beitr. **Biologie der Pflanzen** 64:157-165.
- Judd, W.S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal**. Um Enfoque Filogenético. 3ª Ed. Artmed, Porto Alegre.
- Keeler KH. 1981. Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed defence. **American Journal of Botany** 68: 295–299.
- Kirk Jr., P. W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology** 45:1-4.
- Klein, D.E., Gomes, V.M., Silva-Neto, S.J. & Cunha, M. 2004. The structure of colleters in several species of *Simira* (Rubiaceae). **Annals of Botany** 94: 733-740.
- Kuriachen, P.M. & Dave, Y. 1989. Structural development and histochemical studies in the colleters of *Calotropis* L. (Asclepiadaceae). **Journal of Phytological Research** 2:7-14.
- Le Cointe, P. 1934. **Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas)**. Série: A Amazônia Brasileira, n 3. Livraria Clássica, Belém.
- Lemos, T.L.G., Machado, M.I.L., Menezes, J.E.S.A., Sousa, C.R., 1999. Essential oil of *Croton cajucara* Benth. **Journal of Essential Oil Research** 11: 411–412.
- Lersten, N. R. 1974. Morphology and distribution of Colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 61: 973-981.
- Lersten, N.R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. **Botanical Journal of Linnean Society** 71:311-319.
- Lersten, N. R. & Horner, H. T. Jr. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 55: 1089-1099.
- Lersten, N.R. and J.D. Curtis. 1974. Colleter anatomy in red mangrove, *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae). **Canadian Journal of Botany** 52: 2277-2278.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** 8: 21-75.
- Lopes, D., Bizzo, H.R., Sa-Sobrinho, A.F., Pereira, M.V.G., 2000. Linalool-rich essential oil from leaves of *Croton cajucara* Benth. *Journal of the Essential Oil Research* 12: 705–708.
- Lopes, K.L.B.; Thadeo, M.; Azevedo, A.A.; Soares, A.A. & Meira, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany** 87: 202-209.

- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Brabo, S.N., Da Silva, M.N., 1998b. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry** **49**: 823–828.
- Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Arruda, A.C., Pamplona, S.G.S.R., Vanderlinde, F.A., Lapa, A.J., Echevarria, A., Grynberg, N.F., Côlus, I.M.S., Farias, R.A.F., Costa, A.M.L., Rao, V.S.N. 2000. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of the Ethnopharmacology** **70**: 41–55.
- Meira, R.M.S.A. & Martins, F.M. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore** **27**: 109-112.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Vol. I. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1983. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2nd. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- McManus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology** **23**: 99-108.
- Mohan, J.S.S. & Inamdar, J.A. 1986. Ultrastructure and secretion of extrafloral nectaries of *Plumeria rubra* L. **Annals of Botany** **57**: 389-401.
- Moreno, P.R.; Lima, M.E.L.; Caruzo, M.B.R.; Torres, D.S.C.; Cordeiro, I. & Yong, M.C.M. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) leaves. **Journal of Essential Oil Research** **21**: 190-192.
- Müller, J. 1873. *Croton*. Pp. 81-274 In: Martius, C.F.P. von. **Flora brasiliensis**. Vol 11(2). Munich. Vienna & Leipzig.
- O'Brien, T.P. & McCully, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- Paiva, E.A.S. & Machado, S.R. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology** **66**: 301-308.
- Paiva E.A.S. 2012. Colleters in *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae): structure, secretion and evidences for young leaf protection. **The Journal of the Torrey Botanical Society** **139**: 1–8.
- Pearse, A. G. E. 1980 . **Histochemistry theoretical and applied**, vol. 2, 4 ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.
- Riina, R.; Berry, P.E. & VanEe, B.W. 2009. Molecular phylogenetics of the Dragon's Blood *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany** **34(2)**: 360-374.

- Riina, R.; VanEe, B.W.; Wiedenhoef, A.C.; Cardozo, A. & Berry, P.E. 2010. Sectional rearrangement of arborescent clades of *Croton* (Euphorbiaceae) in South America: Evolution of arillate seeds and a new species, *Croton domatifer*. **Taxon** **59**: 1147-1160.
- Rosa, M.D.S., Mendonça, R.R., Bizzo, H.R., Rodrigues, I.D., Soares, R.M.A., Souto-Padron, T., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., 2003. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** **47**: 1895–1901.
- Rudall, P. 1989. Laticifers in vascular cambium and wood of *Croton* spp. (Euphorbiaceae). **IAWA Bulletin n.s.** **10**(4): 379-383.
- Rudall, P. 1994. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **81** (2): 270-282.
- Sá-Haiad, B.; Serpa-Ribeiro, A.C.C.; Barbosa, N.C.; Pizzini, D.; Leal, D. de O.; Senna Vale, L. & Santiago-Fernandes, L.D.R. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Systematic and Evolution** **283**: 179-202.
- Salatino, A.; Salatino, M.L.F. & Negri, G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** **18**: 11-33.
- Santos, F.V., Mesquita, S.F.P., Faria, M.J.S.S., Poersch, A., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., Morimoto, H.K., Cólus, I.M.S., 2006. Absence of mutagenicity in somatic and germ cells of mice submitted to subchronic treatment with an extract of *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Genetics Molecular and Biology** **29**: 159–165.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **American Journal of Botany** **29**: 464-471.
- Solereder H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Thadeo, M.; Cassino, M.F.; Vitarelli, N.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of foliar glands of *Prockia crucis* p. Browne ex. L. (Flacourtiaceae). **American Journal of Botany** **95**: 1515-1522.
- Thiers, B. [continuously updated]. **Index Herbariorum**: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium.
<http://sweetgum.nybg.org/ih/>
- Thomas, V. & Dave, Y. 1989. Structure, origin, development and senescence of colleters in *Nerium indicum* Mill. (N. odorum Soland., Apocynaceae). **Korean Journal of Botany** **32**:163-172.
- Thomas, V., Dave, Y. & Menon, A.R.S. 1989. Anatomy and histochemistry of colleters in *Roupelia grata* (Apocynaceae). **Nordic Journal of Botany** **8**:493-496.

- Thomas, V. 1991. Structural, Functional and Phylogenetic Aspects of the Colleter. *Annals of botany* 68: 287-305.
- Ubillas R, Jolad SD, Bruening RC, Kernan MR, King SR, King Sesin DF, Barrett M, Stoddart CA, Flaster T, Kuo J, *et al.* 1994. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (sangre de drago). **Phytomedicine** 1: 77–106.
- Van Ee, B.W., Jelinski, N., Berry, P.E., & Hipp§, A.L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. **Molecular Ecology** 15: 2735–2751.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2011. *Croton* Section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a Novel New World Group, and a New Subsectional Classification of *Croton* Section *Lamprocroton*. **Systematic Botany** 36(1): 88–98.
- VanEe, B.W.; Riina, R. & Berry, P.E. 2011. A revised infragenérico classification and molecular phylogeny of new world *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** 60: 1-33.
- Vega, A.S., Castro, M.A. & Anderson, W.R. 2002. occurrence and phylogenetic significance of latex in the malpighiaceae. **American Journal of Botany** 89(11): 1725-1729.
- Vitarelli, N.C. & Santos, M. 2009. **Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae)**. *Acta botanica brasílica* 23(4): 923-928.
- Wagner, H. 1997. Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. In: **The biology and chemistry of the Compositae**. Heywood, V.H.; Harborne, J.B. & Turner, B.L. Vol.I. Academic Press Inc. London. Pp 411-435.
- Webster, G.L. 1975. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. **Taxon** 24: 593-601.
- Webster, G.L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden** 81: 33-144.
- Webster, G.L. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** 42: 793-823.
- Webster, G. L.; Del-Arco Aguilar, M.J. & Smith, B.A. 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 121: 41-57.
- Wiedenhoef, A.C., Riina, R. & Paul E. Berry. 2009. “Ray-intrusive” laticifers in species of *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae). **IAWA Journal** 30 (2): 135–148.
- Wurdack, K.J. & Davis, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany** 96: 1551-1570.

Apêndice I: Lista de espécies, voucher (herbário) e número do coletor

	Espécie	Voucher, coletor
Lamprocroton	1. <i>Croton ceanothifolius</i> Baill.	SP, Lima 325
	2. <i>Croton dichrous</i> Müll. Arg.	HUEMG, Alvim 46/ Vitarelli 012/ SP, Cordeiro 2771/ SP, Stehmann 2504
	3. <i>Croton erythroxyloides</i> Baill.	VIC, Vitarelli 002/ VIC, Vitarelli 005/ VIC, Vitarelli s/n°
	4. <i>Croton imbricatus</i> L.R. Lima & Pirani	SP, Laessor s/n°/ SPF, Furlan s/n°
	5. <i>Croton muellerianus</i> L.R. Lima	BHCB, Ribas 926
	6. <i>Croton myrianthus</i> Müll. Arg.	SP, Lima 296
	7. <i>Croton pallidulus</i> Baill.	SP, Lima 319
	8. <i>Croton pseudoadipatus</i> Croizat	HUEMG, Monteiro <i>et al</i> 009 /HUEMG, Monteiro <i>et al</i> 017
	9. <i>Croton Pygmaeus</i> L. R. Lima	BHCB, Falkenberg 6483/ BHCB, Marchett 549
	10. <i>Croton splendidus</i> Mart.	HUEMG, Alvim s/n°/ HUEMG, Alvim 40/VIC, Vitarelli s/n°*/ VIC, Vitarelli s/n°
	11. <i>C. gnaphalli</i> Baill.	BHCB, Marchett 545
Cleodora	12. <i>Croton billbergianus</i> Müll. Arg.	RB, Wiley 7
	13. <i>Croton cajucara</i> Benth.	SP, Caruzo 95/ RB, Jangoux 1051
	14. <i>Croton campanulatus</i> Caruzo & Cordeiro	SP, Lima 469/ RBR Monteiro 7964-I
	15. <i>C. fragrans</i> Kunth	SP, Caruzo <i>et al.</i> 125
	16. <i>C. hemiargyreus</i> Müll.Arg	SP, Caruzo 114/ RB, Nascimento 473
	17. <i>C. heterocalyx</i> Baill	SP, Caruzo 108
	18. <i>Croton organensis</i> Baill.	SP, Caruzo 90/ RB, Prado 366
	19. <i>C. orinocensis</i> Müll.Arg.	SP, Caruzo 124
	20. <i>Croton rottlerifolius</i> Baill.	SPF, Lima 139
	21. <i>Croton salutaris</i> Casar.	SP, Caruzo 89/ RBR, Pardo 108
	22. <i>Croton sphaerogynus</i> Baill.	SP, Caruzo 88/ RB, Landrum 2052
	23. <i>Croton spruceanus</i> Benth.	RB, Ducke s/n°.
Grupo Externo	24.. <i>Croton alabamensis</i> E. A. Smith ex Chapman	SP, Keener 2472/ VIC, Berry s/n°
	25. <i>C. burchellii</i> Müll. Arg.	SPF, Lima 257
	26.. <i>C. cuneatus</i> Klotzsch	INPA, Lima 1510
	27. <i>Croton palanostigma</i> Klotzsch	SP, Cordeiro 192
	28. <i>C. sacaquinha</i> Croizat	HB, Rodrigues s/n°
	29. <i>Astraea lobata</i> (L.) Klotzsch	SP, Melo 1285
	30. <i>Brasiliocroton mamoninha</i> Berry & Cordeiro	SPF Fiaschi 951

Capítulo II:
**“Evolução dos caracteres estruturais foliares no gigante
gênero *Croton* (Euphorbiaceae): um estudo de caso da seção
Cleodora”**

Evolução dos caracteres estruturais foliares no gigante gênero *Croton* (Euphorbiaceae): um estudo de caso da seção *Cleodora*

Resumo: A seção *Cleodora* foi descrita como monofilética à luz da filogenia molecular. A seção se destaca pela sua ampla distribuição nos ecossistemas florestais do Brasil e por incluir representantes tradicionalmente utilizados na medicina popular. A história evolutiva dos caracteres anatômicos foliares, em especial a diversidade e distribuição das estruturas secretoras foi utilizada para contribuir com o esclarecimento das interrelações das espécies de *Cleodora*. Uma matriz de dados moleculares, considerando regiões do genoma nuclear (ITS) e plastidial (*trnL-trnF* e *psbA-trnH*) foi construída com as sequências de nucleotídeos disponibilizadas no GenBank. Uma matriz morfológica foi elaborada com 33 caracteres de morfologia externa disponíveis na literatura. Através do estudo da anatomia foliar, 19 caracteres anatômicos foram selecionados para a elaboração de uma matriz de dados anatômicos considerando os diferentes estados de caráter. As matrizes molecular, morfológica e anatômica foram concatenadas em uma abordagem de evidência total mediante análises de Máxima Parcimônia e de Inferência Bayesiana. Os caracteres anatômicos combinados com os moleculares mostraram-se mais relevantes na resolução da topologia dos ramos internos na seção *Cleodora* que os morfológicos, e elevam os valores de suporte destes ramos, contribuindo com o esclarecimento das relações entre as espécies desta seção. Foi feita a reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres anatômicos sobre a filogenia molecular. A otimização dos caracteres estruturais na filogenia molecular permitiu a identificação de apomorfias e plesiomorfias de *Cleodora* e outras linhagens de *Croton* que compõem o grupo externo.

Palavra chave: reconstrução do estado ancestral, evidência total, filogenia, estruturas secretoras, anatomia foliar.

INTRODUÇÃO

O gênero *Croton* L. se destaca na família Euphorbiaceae pelo elevado número de espécies, acentuada diversidade morfológica e distribuição predominantemente tropical. Entretanto, é na região Neotropical onde está a maior concentração de suas espécies, tendo como principais centros de diversidade o Brasil, as Antilhas e o México (Burger & Huft 1995). Euphorbiaceae encontra-se organizada em 3 subfamílias: Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae (Chase *et al* 2002; Judd *et al* 2009). *Croton* está incluído em Crotonoideae apresentando cerca de 1220 espécies (Govaerts *et al.* 2000), número que corresponde a aproximadamente metade do total de espécies desta subfamília que totaliza cerca de 2.400 espécies (Webster 1994). As espécies de *Croton* podem ser herbáceas, arbustivas, lenhosas e ocasionalmente lianas, com distribuição pantropical (Webster 1993; Govaerts *et al.* 2000).

A taxonomia e a sistematização de *Croton* são complexas devido ao grande número de espécies, a diversidade morfológica, a ampla distribuição geográfica e a falta de distintas sinapomorfias morfológicas para as suas seções (Riina 2006). A monofilia sugerida para *Croton* a partir de dados morfológicos (Webster 1994b) não foi confirmada pelas análises moleculares (Berry *et al.* 2005). *Croton* passou a ser monofilético (Berry *et al.* 2005) pela sinonimização de *Moacroton* Croizat com *Croton* e pelo restabelecimento do gênero *Astraea* Klotzsch (Berry *et al.* 2005; Van Ee *et al.* 2011) que correspondia a uma seção na classificação de Webster (1993).

Webster (1993) organizou *Croton* em 40 seções com base em caracteres morfológicos, entretanto análises filogenéticas moleculares têm demonstrado que muitas destas seções (Webster 1993) não são monofiléticas (Berry *et al.* 2005; Van Ee *et al.* 2006; Lima & Pirani 2008; Riina *et al.* 2009, 2010; Van Ee & Berry 2010; Caruzo *et al.* 2011; Van Ee *et al.* 2011; Van Ee & Berry 2011). As revisões da classificação infragenérica de *Croton* (Berry *et al.* 2005; Van Ee *et al.* 2011), que consideraram apenas dados moleculares proporcionaram uma classificação mais natural. Entretanto, a taxonomia do gênero ainda não está completamente resolvida, pois foram revistas apenas as seções *Argyroglossum* Baill. (Gomes 2006), *Cleodora* (Klotzsch) Baill. (Caruzo *et al.* 2011), *Crotonopsis* (Michx.) G.L. Webster (Van Ee & Berry 2009), *Cyclostigma* Griseb. (Riina *et al.* 2009), *Cuneati* (G.L. Webster) Riina & Berry (Riina *et al.* 2010), *Heptallon* (Raf.) Müll. Arg. (Van Ee & Berry 2010), *Lamprocroton* (Müll.

Arg.) Pax in Engler & Prantl (Lima & Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011), *Luntia* (Neck. Ex Raf.) G.L. Webster (Riina *et al.* 2010) e *Pedicellati* B.W. VanEe & P.E. Berry (VanEe & Berry 2011).

Dentre essas seções, *Cleodora* se destaca pela grande quantidade de espécies nos ecossistemas florestais do Brasil (Caruzo *et al.* 2011) e pela utilização medicinal de algumas de suas espécies, em especial *Croton cajucara* (Salatino *et al.* 2007). Na filogenia molecular da seção *Cyclostigma* Griseb (Riina *et al.* 2009), duas espécies previamente circunscritas nesta seção (Webster 1993), *C. organensis* Baill. e *C. warmingii* Müll. Arg. (= *C. rottlerifolius* Baill.), emergiram no mesmo clado de *C. cajucara* e *C. hoffmannii*, espécies da seção *Cleodora sensu* Webster (1993). Caruzo *et al.* (2011) verificaram que *C. fragrans*, previamente na seção *Lasiogyne* (Webster 1993), também aparece no mesmo clado de *C. organensis*, *C. rottlerifolius*, *C. cajucara* e *C. hoffmannii*. A necessidade de uma revisão detalhada da seção *Cleodora* se fazia evidente, e Caruzo *et al.* (2011) realizaram um estudo de filogenia molecular a partir do qual uma nova circunscrição para esta seção foi estabelecida.

A revisão da seção *Cleodora*, onde foram considerados dados morfológicos e moleculares, proporcionou a delimitação de uma seção monofilética que compreende dezoito espécies (*sensu* Caruzo *et al.* 2011) organizadas em duas subseções: 1. subseção *Sphaerogyni* Caruzo (*C. cajucara* Benth., *C. campanulatus* Caruzo & Cordeiro, *C. hemiargyreus* Müll.Arg., *C. heterocalyx* Baill., *C. organensis* Baill., *C. rufolepidotus* Caruzo & Riina, *C. salutaris* Casar., *C. sphaerogynus* Baill., *C. stellatoferrugineus* Caruzo & Cordeiro) e 2. subseção *Spruceani* Caruzo (*C. billbergianus* Müll.Arg., *C. sexmetralis* Croizat, *C. fragrans* Kunth, *C. fragrantulus* Croizat, *C. hoffmannii* Müll.Arg., *C. orinocensis* Müll.Arg., *C. pseudofragrans* Croizat, *C. rottlerifolius* Baill., *C. spruceanus* Benth).

Estudos complementares são importantes para a compreensão da evolução dos caracteres em *Cleodora*, possibilitando o reconhecimento de estruturas plesiomórficas ou apomórficas compartilhadas entre suas espécies. A Anatomia Vegetal é uma ferramenta útil em estudos desta abordagem e os caracteres anatômicos têm sido utilizados com sucesso como subsídio para as análises filogenéticas, principalmente no que se refere a identificar homologias e analogias, que permitam determinar homoplasias. Trabalhos desta natureza têm sido realizados em diversas famílias (Goldberg 1986; Tokuoka & Tobe 1998; Scatena *et al.* 1999; Alves *et al.* 2002; Sartori & Tozzi 2002; Gomes *et al.* 2005; Thadeo *et al.* 2008; Delgado *et al.* 2009; Horn *et al.*

2009; Lopes *et al.* 2009; Sá-Haiad *et al.* 2009; Wiedenhoeft *et al.* 2009; Araújo *et al.* 2010; De-Paula 2010; Coutinho *et al.* 2010; Riina *et al.* 2010; Mello-Silva *et al.* 2011; Nishida & Werff 2011; Mantovani *et al.* 2012; Pecnikar *et al.* 2012; Zhou & Xia 2012; Chin *et al.* 2013;).

A presença e o tipo de tricomas têm sido utilizados na delimitação em níveis infragenéricos de *Croton* (Müller 1873; Webster 1993, 1994; Webster *et al.* 1996; Berry *et al.* 2005; Lima & Pirani 2008; Caruzo *et al.* 2011; VanEe & Berry 2011; VanEe *et al.* 2011) e a presença de estruturas secretoras tem sido relatada no gênero (Fahn 1979; Jose & Inamdar 1989; Seigler 1998; Maciel *et al.* 1998b; Campos *et al.* 2002; Salatino *et al.* 2007; Moreno *et al.* 2009; De-Paula *et al.* 2010; Caruzo *et al.* 2011), entretanto, a importância de tais estruturas nos estudos de filogenia, bem como sua história evolutiva dentro do gênero ainda não foram avaliadas.

O objetivo da presente proposta foi realizar um estudo de anatomia foliar das espécies de *Croton* seção *Cleodora sensu* Caruzo *et al.* (2011) visando elaborar uma matriz dos caracteres anatômicos diagnósticos para o mapeamento dos mesmos sobre a filogenia molecular da seção, reconhecendo simplesiomorfias e sinapomorfias que possam elucidar a história evolutiva desses caracteres. Foi também objetivo deste trabalho avaliar a influência dos caracteres morfoanatômicos na resolução das interrelações filogenéticas entre as espécies de *Cleodora*, mediante uma análise combinada das matrizes moleculares, morfológicas e anatômicas.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram analisadas 19 espécies de *Croton*, incluindo 12 espécies da seção *Cleodora*: *C. billbergianus* Müll.Arg., *C. cajucara* Benth., *C. campanulatus* Caruzo & Cordeiro, *C. fragrans* Kunth, *C. hemiargyreus* Müll.Arg., *C. heterocalyx* Baill., *C. organensis* Baill., *C. orinocensis* Müll.Arg., *C. rottlerifolius* Baill., *C. salutaris* Casar., *C. sphaerogynus* Baill., e *C. spruceanus* Benth. Para compor o grupo externo foram selecionadas: *C. cuneatus* Klotzsch (seção *Cuneati*), *C. gnaphalli* Baill. (subseção *Argentini*, seção *Lamprocroton*), *C. palanostigma* Klotzsch (seção *Luntia*), *C. pallidulus* Baill. (subseção *Lamprocroton*, seção *Lamprocroton*), *C. sacaquinha* Croizat (seção *Lasiogyne*), *Astraea lobata* (L.) Klotzsch e *Brasiliocroton mamoninha* Berry & Cordeiro.

Devido à dificuldade de obtenção de amostras em expedições de campo ou nos herbários nacionais e internacionais consultados (Apêndice I), não foi possível proceder

a análise das seguintes espécies de *Cleodora*: *C. fragrantulus* Croizat., *C. hoffmannii* Müll. Arg., e *C. pseudofragrans* Croizat., *C. rufolepidotus* Caruzo & Riina, *C. sexmetralis* Croizat e *C. stellatoferrugineus* Caruzo & Cordeiro.

Anatomia

Amostras das folhas são provenientes de material herborizado (Apêndice I), sendo analisadas folhas em diferentes estádios de desenvolvimento (primórdios foliares, folhas jovens e completamente expandidas), seguindo a mesma padronização adotada por Vitarelli (2013, Cap. II).

Após a reversão da herborização (Smith & Smith 1942), as amostras foram desidratadas em série etílica e estocadas em etanol 70%. Para obtenção de cortes o material foi incluído em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments) seguindo o procedimento de Meira & Martins (2003). Foram obtidos cortes transversais e longitudinais (5 µm de espessura), em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.) com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981) e as lâminas montadas com água glicerizada ou com resina sintética tipo Permount (Fischer 1968).

Peças inteiras foram diafanizadas, coradas com safranina (1% solução alcoólica) e as lâminas montadas com gelatina glicerizada (Johansen 1940, modificado).

Todas as observações e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical) equipado com sistema de captura de imagens. Para a observação sob luz fluorescente, foi utilizado o filtro UV.

Foram selecionados 19 caracteres anatômicos para a elaboração de uma matriz de dados considerando os diferentes estados de caráter (Apêndice II). Os dados relativos às estruturas secretoras foram obtidos a partir do trabalho de Vitarelli (2013, Cap. II).

Dados Moleculares e Amostragem Taxonômica

Sequências do genoma nuclear ribossomal ITS e dos dois marcadores cloroplastidiais *trnL-F* e *psbA-trnH* de espécies de *Cleodora* e do grupo externo foram obtidas no GenBank (Appendix I). As sequências de cada marcador foram montadas e alinhadas em BioEdit v. 7.1.3.0 (Hall 1999) e posteriormente combinadas em distintas matrizes de dados.

Foram analisadas três matrizes: A **Matriz A** inclui 2435 caracteres moleculares, 33 caracteres morfológicos (obtidos de Caruzo 2010) e 19 caracteres anatômicos gerados pelo presente estudo. A **Matriz B** inclui 2435 caracteres moleculares e os 19 caracteres

anatômicos (tendo sido removidos os caracteres morfológicos). **Matriz C** que inclui somente caracteres moleculares: com 2435 caracteres moleculares (724 de ITS; 1711 de *trnL-trnF*, e 673 de *trnH-psbA*).

Análises Filogenéticas

Buscas heurísticas em Máxima Parcimônia (MP) realizadas no programa PAUP* 4.0b (Swofford 2002) com 1000 replicagens aleatórias dos taxa usando TBR branch-swapping. Todos os caracteres foram incluídos nas análises. Os caracteres foram tratados como de igual peso e os GAPs como “missing data”. Os valores de MP bootstrap (BS) para as matrizes combinadas do genoma nuclear e plastidial foram estimadas com 1000 replicagens de bootstrap com 100 replicagens adicionais aleatóreas (RASR), tree bisection reconnection (TBR) e nchuck = 100.

As análises Bayesianas foram conduzidas em MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As probabilidades posteriores (“posterior probabilities” -PP) foram calculadas a partir do método estatístico de Cadeia Markov de Monte Carlo (MCMC), consistindo de 4 cadeias ligadas (nchains = 4; nruns = 2; heat = 0.02), 10000000 gerações, com amostragem a cada 100 gerações. Todos os caracteres foram incluídos nas analyses e os dados foram divididos em quatro partes (três parte genéticas: ITS, *trnL-F*, and *trnH-psbA* e, para algumas análises foi incluída a parte de dados morfológicos/anatômicos, de acordo com as matrizes B e C descritas acima). O programa JModelTest v. 0.1.1 (Posada, 2008), através do critério Akaike Information Criterion (AIC; Akaike 1974), foi utilizado para estimar os melhores modelos de evolução para cada uma das partes genéticas, sendo selecionado para ITS o modelo GTR + G. para *trnL-F* o modelo TPM3uf+G e para *trnH-psbA* o modelo TPM1uf+I+G). O modelo MK foi o utilizado para a parte de dados morfológicos/anatômicos (Lewis 2001). O período padrão de burn-in foi utilizado (burninfrac=0,25). Após a remoção das árvores indicadas neste período, os valores de PP foram obtidos pela regra de maior consenso a partir das análises de MCMC.

Reconstrução do Estado de Caráter Ancestral

Foi elaborada uma matriz de dados com 19 caracteres anatômicos diagnósticos obtidos através do estudo de anatomia foliar realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, Brasil) para proceder o mapeamento destes dados sobre as árvores resultantes utilizando o programa Mesquite v. 2.75 (Maddison and Maddison 2006, 2010).

A Reconstrução do Estado Ancestral foi feita utilizando-se um grupo de 1000 árvores selecionadas aleatóreamente após o período de burn-in das análises Bayesianas da matriz de dados moleculares. Seguindo a metodologia utilizada por Horn *et al.* (2012), foram criados dois blocos no Mesquite v. 2.75: o primeiro bloco compreendendo as 1000 árvores selecionadas aleatoriamente e o segundo bloco contendo a árvore gerada pela regra de maior consenso pelas análises Bayesianas. Esta árvore consenso foi utilizada como base para o mapeamento dos caracteres e a análise foi acionada pelo comando “trace characters over trees”, utilizando-se otimizações em Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) para cada um dos caracteres plotados no bloco das 1000 árvores em “stored trees”. O modelo MK1 de parâmetro simétrico (Lewis 2001) foi selecionada para todos os 19 caracteres. O estado ancestral foi atribuído a um nó se a sua probabilidade era $> 2 \log$ do que a probabilidade de ocorrer um outro estado ancestral (estimativa padrão em Mesquite 2.75). O conjunto de reconstruções de cada um dos caracteres foi sumariado na árvore de maior consenso gerada na análise Bayesiana e salvos no formato “pdf” para posterior artefinalização em Coreldraw X5.

Os caracteres 11 (laticíferos) e 19 (nectários nos primórdios foliares) não foram plotados nas árvores ilustradas nos resultados do presente trabalho, porém foram analisadas e discutidas abaixo.

RESULTADOS

Análises Filogenéticas: molecular e combinadas (Evidência Total)

As topologias das árvores geradas pelas matrizes A, B e C são comparadas entre si tanto nas análises de Máxima Parcimônia (MP, Figs. 1, 2 e 3) como de Inferência Bayesiana (IB, Figs. 4 e 5).

As árvores filogenéticas de Evidência Total (matrizes A e B; Figs. 1, 2, 4 e 5) suportam a monofilia da seção *Cleodora* e a sua subdivisão nas subseções *Sphaerogyni* e *Spruceani*; este resultado é congruente com aquele mostrado pela filogenia molecular (matriz C; Figs. 3 e 5), na qual a monofilia de *Cleodora* é bem suportada (87% BS e 0,9 PP), assim como a sua subdivisão em duas seções (95% BS e 1,0 PP para *Sphaerogyni* e 99% BS e 1.0 PP para *Spruceani*).

Máxima Parcimônia:

Os resultados das análises de MP mostram que dentro de *Cleodora*, as topologias das árvores geradas pelas matrizes A, B e C são distintas, sendo que a

topologia da árvore gerada pela matriz A possui um maior grau de politomias (Fig. 1). A árvore consenso da matriz A mostra que dentro da subseção *Sphaerogyni* o clado 1 constituído por *C. organensis*, *C. cajucara*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* forma uma politomia (com 99% BS), não havendo resolução para as afinidades filogenéticas entre estas espécies. As relações entre as espécies deste clado encontram-se resolvidas nos ramos das árvores geradas pelas matrizes B e C (com 99% BS em ambas). Dentro da subseção *Spruceani*, *C. fragrans* emerge como grupo irmão das demais espécies nas árvores geradas pelas três matrizes. Nas árvores geradas pelas matrizes A (Fig. 1) e C (Fig. 3) existe uma politomia na base dos ramos das demais espécies desta subseção, o que não ocorre na árvore gerada pela matriz B (Fig. 2), na qual verifica-se que *C. bilbergianus* emerge em um ramo externo aos dois clados irmãos (*C. spruceanus* (*C. orinocensis*, *C. pseudofragrans*)) e (*C. fragrantulus*, (*C. hoffmannii*, *C. rottlerifolius*)). Ainda na subseção *Spruceani*, a árvore gerada pela matriz A (Fig. 1) mostra uma politomia entre as espécies *C. orinocensis*, *C. pseudofragrans* e *C. spruceanus* (96% BS), já as árvores geradas pelas matrizes B (Fig. 2) e C (Fig. 3) mostram a seguinte relação entre essas espécies (*C. spruceanus* (*C. orinocensis*, *C. pseudofragrans*)).

Na árvore consenso da matriz A (Fig. 1), as relações entre *Cleodora* e demais espécies de *Croton* do grupo externo não estão esclarecidas e são ilustradas como uma politomia. Nas árvores geradas pelas matrizes B (Fig. 2) e C (Fig. 3), *C. yavitisensis* e *C. cuneatus* (Seção *Cuneati*) aparecem como grupo irmão da seção *Cleodora* (58% BS; 54% BS, respectivamente).

Inferência Bayesiana: Nas árvores filogenéticas resultantes das três matrizes analisadas (A, B e C) a seção *Cleodora* aparece como um grupo monofilético, altamente suportado (1PP matriz A; 0.9PP matrizes B e C). Assim como ocorreu nas análises de MP, a árvore resultante da matriz A também mostrou politomias em determinados ramos (Fig. 4). Mais uma vez a interrelação entre *C. organensis*, *C. cajucara*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* mostrou-se confusa, sendo possível identificar apenas uma maior proximidade entre *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx*, porém com baixo suporte (0,5 PP). A relação de *Cleodora* com o grupo externo também é confusa na árvore gerada pela matriz A (Fig. 4), não sendo possível reconhecer quais seriam as espécies de *Croton* mais proximamente relacionadas a essa seção. Nas árvores geradas pelas matrizes B e C (Fig. 5) estas politomias não ocorrem e dentro de *Cleodora*, na subseção *Sphaerogyni*, observa-se a resolução do clado (*C. organensis* (*C. cajucara* (*C. sphaerogynus*, *C. heterocalyx*)))) com alto suporte. A relação de *Cleodora* com as

espécies do grupo externo encontra-se esclarecida nas árvores geradas pelas matrizes B e C (Fig. 5) e *C. yavitensis* e *C. cuneatus* (seção *Cuneati*) emergem como grupo irmão de *Cleodora*.

Reconstrução dos Estados Ancestrais dos caracteres anatômicos

As figuras (6, 7, 8 e 9) ilustram a reconstrução do estado ancestral sobre as 1000 árvores escolhidas aleatoriamente e plotadas na árvore consenso resultante da análise de inferência Bayesiana.

O resultado da reconstrução (Figs. 6 a 9) demonstra que o nó da base do ramo entre as seções *Cuneati* e *Cleodora* está ausente em cerca de metade das árvores analisadas, considerando todos os caracteres avaliados. Assim, a seção *Cuneati* não corresponde ao grupo irmão de *Cleodora* em metade das 1000 árvores analisadas. O mesmo foi detectado para a base dos ramos do clado ((*C. spruceanus* (*C. orinocensis*, *C. pseudofragrans*)) (*C. fragrantulus* (*C. hoffmannii*, *C. rottlerifolius*))), mostrando que a interrelação entre essas espécies não está completamente elucidada.

Devido à ausência de dados para *C. yavitensis*, *C. pseudofragrans*, *C. fragrantulus* e *C. hoffmannii*, os estados de caráter destas espécies foram marcados na matriz como ‘missing data’ para todos os caracteres. Por isso, no nó da base dos ramos terminais em que essas espécies aparecem, ocorrem reconstruções equívocas. Devido a proximidade entre as espécies, para efeito de interpretação dos caracteres reconstruídos, foi considerado para *C. yavitensis* os mesmos estados plotados para *C. cuneatus* em cada caráter avaliado. O mesmo procedimento foi adotado para *C. rottlerifolius*, *C. hoffmannii*, *C. fragrantulus* e *C. pseudofragrans*.

Os resultados obtidos a partir da otimização de cada um dos caracteres analisados são descritos abaixo.

Idioblastos secretores (caracteres 1 e 2, Figura 6): Os idioblastos secretores apresentam uma distribuição complexa nas folhas das espécies de *Croton*. As reconstruções são equívocas no nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas. Em *Astraea lobata* os idioblastos ocorrem voltados apenas para a face adaxial das folhas, contrastando com *Brasiliocroton mamoninha*, que possui idioblastos secretores voltados apenas para a face abaxial. O estado ancestral para *Croton* é a presença de idioblastos voltados apenas para a face abaxial das folhas (Figura 6A), tendo sido reconstruído no nó da raiz em 513 árvores e nas demais (487) as reconstruções foram equívocas. Idioblastos voltados para a face abaxial representam o estado ancestral para a seção

Cleodora, reconstruído no nó de sua raiz em 999 árvores. Já para a subseção *Sphaerogyni* a distribuição dos idioblastos não apresentou um padrão, sendo que em todas as 1000 árvores ocorreram reconstruções equívocas para o nó da raiz desta subseção. No clado 2 de *Sphaerogyni* (que compreende *C. hemiargyreus*, *C. campanulatus* e *C. salutaris*) idioblastos secretores voltados para a face abaxial são mantidos em *C. hemiargyreus* e em *C. salutaris*, já em *C. campanulatus* os idioblastos secretores ocorrem voltados para ambas as faces da folha. No clado 1 desta mesma subseção (que compreende *C. organensis*, *C. cajucara*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx*) idioblastos secretores voltados para ambas as faces estão presentes em *C. organensis*, *C. cajucara* e *C. sphaerogynus* e a presença de idioblastos voltados apenas para a face abaxial se mantém em *C. heterocalyx*. Na subseção *Spruceani* este estado distribui-se em todas as suas espécies, porém com uma diferença marcante do ancestral comum de *Cleodora*: nas espécies desta subseção os idioblastos secretores voltados para a face abaxial sobressaltam o nível da epiderme e apresentam-se em um estado transitório entre estruturas secretoras internas e externas (caráter 2, Fig. 6B). Este estado transitório foi reconstruído no nó da raiz de *Spruceani* em todas as 1000 árvores analisadas, enquanto que o estado não transitório (idioblasto secretor) foi reconstruído no nó da raiz de *Cleodora* em 927 árvores.

Dentre as espécies do grupo externo, idioblastos secretores voltados para a face abaxial, em estado não transitório, ocorrem na seção *Cuneati* e em *C. palanostigma* (seção *Luntia*) e idioblastos secretores voltados apenas para a face adaxial ocorrem em *C. gnaphalii* e *C. pallidulus* (seção *Lamprocroton*) e em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*).

Tricomas Secretores (caráter 3, Figura 6): Os tricomas secretores, quando presentes em *Croton*, ocorrem somente na epiderme da face abaxial das folhas (Figura 6C). A ausência de tricomas secretores é o estado ancestral, verificado tanto em *Astraea lobata* quanto em *Brasiliocroton mamoninha*. A ausência desses tricomas foi reconstruída no nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas, bem como no nó da espinha dorsal de quase toda a árvore. A ocorrência de tricomas secretores é restrita à *C. gnaphalii* e à *C. pallidulus* (seção *Lamprocroton*) e à *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*). A evolução deste estado parece estar relacionada com restritas linhagens provenientes de um ancestral comum a todo o gênero *Croton*, o que justifica a ocorrência de reconstruções equívocas em 41 árvores no nó da raiz de *Croton* e da ausência de

tricomas secretores nas demais 959 árvores. Tricomas secretores são ausentes em *C. palanostigma* e em todas as espécies das seções *Cuneati* e *Cleodora*.

Coléteres (em folhas completamente expandidas – caráter 4 e nos primórdios foliares – caráter 5, Figura 7): A presença de coléteres foliares é uma característica compartilhada por *Astraea*, *Croton* e *Brasiliocroton*. Este estado foi reconstruído no nó da raiz das 1000 árvores analisadas. Em *Brasiliocroton mamoinha* os coléteres são caducos e por isso foram observados apenas nos primórdios foliares. A reconstrução demonstra que todas as espécies de *Croton* evoluíram de um ancestral comum que apresentava coléteres foliares, pois no nó da raiz do gênero, coléteres foliares foram reconstruídos em todas as 1000 árvores analisadas. A única espécie do gênero em que estas estruturas não foram registradas é *C. gnaphalii*. A posição mais comum dos coléteres em *Croton* é ao longo da margem das folhas, entretanto além desta, em *Astraea lobata* os coléteres ocorrem ainda na base da lâmina foliar (baselaminares) e na região proximal (acropeciolaes) e distal (basepeciolaes) do pecíolo.

Nectários extraflorais (*NEF's*) (caráter 6, Figura 7): A presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes é um caráter diagnóstico para as espécies da seção *Cleodora*. Todas as espécies desta seção compartilham um ancestral comum exclusivo que possuía este caráter. A reconstrução feita para o nó da raiz de *Cleodora*, bem como para a espinha dorsal de sua árvore, mostra a presença de um par de NEF's em todas as 1000 árvores analisadas. Esta reconstrução é observada inclusive no nó da base do ramo terminal de *C. fragrans*, única espécie de *Cleodora* que possui mais de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes, mostrando que esta é uma variação do estado ancestral. NEFs também ocorrem na seção *Cuneati* o que sugere que esta seção compartilhe um ancestral comum com *Cleodora*, que possuía um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes. Reforçando essa hipótese observa-se que *Cuneati* aparece como grupo irmão de *Cleodora* em 486 árvores e em todas elas a presença de NEF's baselaminares/acropeciolaes foi reconstruída. Dentre os demais grupos externos, NEF's baselaminares/acropeciolaes também ocorrem em *C. palanostigma* e são ausentes em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*) e na seção *Lamprocroton* (- ausência de NEF's baselaminares/acropeciolaes: 1000) em *C. gnaphalii* (subseção *Argentini*) e em *C. pallidulus* (subseção *Lamprocroton*). No nó da raiz da árvore as reconstruções são equívocas, uma vez que *Astraea lobata* não possui um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes, diferindo de *Brasiliocroton mamoinha* e da maioria das

espécies de *Croton* estudadas. A ausência deste caráter em *A. lobata* mostra que este é o estado ancestral entre os três gêneros, *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*.

Comprimento do pedúnculo dos NEF's baselaminares/acropeciolares (Caráter 7, Figura 8): Este caráter não é aplicável para *Astraea lobata*, *C. sacaquinha*, *C. gnaphalii* e *C. pallidulus* já que não possuem NEF's baselaminares/acropeciolares e por isso nenhum estado foi reconstruído nos respectivos ramos terminais. Como a árvore está enraizada em *A. lobata*, consequentemente as reconstruções são equívocas no nó de sua raiz. No nó da raiz de *Cleodora* as reconstruções foram equívocas em todas as 1000 árvores e as reconstruções encontram-se bem resolvidas apenas nos nós próximos aos ramos terminais. Na subseção *Sphaerogyni* duas tendências evolutivas foram evidenciadas: no clado 2 (*C. hemiargyreus* (*C. campanulatus*, *C. salutaris*)) os NEF's apresentam pedúnculo longo, este estado foi reconstruído no nó deste clado para 999 árvores (sendo que este nó ocorre em 999 das 1000 árvores analisadas). No clado 1 (*C. organensis* (*C. cajucara* (*C. sphaerogynus*, *C. heterocalyx*))) os NEF's são sésseis (*C. cajucara*) ou curto-pedunculados (demais espécies do clado). No nó deste clado, NEF's com pedúnculo curto foi o estado reconstruído em 881 das 1000 árvores analisadas e em 119 destas ocorreram reconstruções equívocas. Na subseção *Spruceani* verifica-se uma tendência evolutiva para seleção de espécies com NEF's de pedúnculo curto (exceto *C. fragrans* que possui NEF's com pedúnculo longo). NEF's com pedúnculo curto constituem o estado ancestral, verificado em *Brasiliocroton mamoninha*, espécie mais basal na qual os NEF's baselaminares/acropeciolares estão presentes. Dentre as demais espécies do grupo externo, NEF's baselaminares/acropeciolares com pedúnculo curto são verificados também em *C. palanostigma* e NEF's sésseis ocorrem na seção *Cuneati*, sendo este estado de caráter uma simplesiomorfia compartilhada entre espécies desta seção e *C. cajucara* (seção *Cleodora*). NEF's com pedúnculo longo representam uma sinapomorfia entre as espécies do clado 2 da subseção *Sphaerogyni*, sendo considerado como um estado de caráter homoplástico por ocorrer nas espécies desse clado e em *C. fragrans* (subseção *Spruceani*).

Superfície secretora dos NEF's baselaminares/acropeciolares (caráter 8, Figura 8): Este caráter é inaplicável para as espécies que não possuem NEF's baselaminares/acropeciolares (*Astraea lobata*, *C. sacaquinha*, *C. gnaphalii* e *C. pallidulus*) e por isso nenhum estado foi reconstruído nos ramos terminais de cada uma dessas espécies. Como a árvore está enraizada em *A. lobata*, consequentemente as reconstruções são equívocas no nó de sua raiz. No nó da raiz de *Cleodora*, NEF's com

superfície convexa foi o estado reconstruído em 576 árvores, ocorrendo reconstruções equívocas para as demais 424 árvores analisadas. Dentro da subseção *Sphaerogyni* verificam-se duas tendências evolutivas: no clado 2 (*C. hemiargyreus* (*C. campanulatus*, *C. salutaris*)) os NEF's apresentam superfície côncava, este estado foi reconstruído no nó deste clado para 999 árvores (sendo que este nó ocorre em 999 das 1000 árvores analisadas). No clado 1 (*C. organensis* (*C. cajucara* (*C. sphaerogynus*, *C. heterocalyx*))) os NEF's apresentam superfície convexa e em seu nó este estado foi reconstruído em todas as 1000 árvores. Esta mesma tendência evolutiva foi verificada na subseção *Spruceani* (exceto em *C. fragrans* na qual ocorrem NEF's com superfície côncava). Em *C. palanostigma*, os NEF's apresentam superfície reta ou convexa com a margem elevada. NEF's com superfície convexa constituem o estado ancestral, verificado em *Brasiliocroton mamoinha* e na seção *Cuneati*. A presença de NEFs com a superfície côncava constitui-se numa sinapomorfia do clado 2 (subseção *Sphaerogyni*), sendo um caráter homoplástico por estar presente também em *C. fragrans* (subseção *Spruceani*).

NEF's na margem da lâmina foliar (caráter 9, Figura 7) e *na superfície da lâmina foliar* (caráter 10, Figura 2): A ausência de NEF's na margem e na superfície da lâmina foliar é o estado ancestral, os quais foram reconstruídos no nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas. NEF's marginais e superficiais não ocorrem em *Astraea lobata*, *Brasiliocroton mamoinha* e, dentre as espécies de *Croton* estudadas, NEF's marginais estão presentes somente na seção *Cuneati* e em *C. orinocensis* (seção *Cleodora*) e NEF's na superfície da lâmina foliar ocorrem apenas em *C. palanostigma*, sendo uma autapomorfia para esta espécie. Estes resultados mostram que NEF's marginais e na superfície da lâmina foliar tiveram uma evolução independente em *Croton*.

Laticíferos (caracteres 11 e 12, Figura 7): Todas as espécies estudadas possuem laticíferos articulados. *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton* provavelmente evoluíram de um ancestral comum latescente. Em *Astraea lobata* os laticíferos são articulados ramificados, em *Brasiliocroton mamoinha* são articulados não ramificados e em *Croton* ocorre uma distribuição complexa dos laticíferos ramificados e não ramificados. No nó da raiz das 1000 árvores analisadas as reconstruções foram todas equívocas, porém no nó da raiz de *Croton* laticíferos articulados não ramificados foi o estado reconstruído para 909 árvores (91 árvores com reconstruções equívocas), sendo este o estado ancestral em *Croton*. Porém, em *Cleodora* predomina a ocorrência de laticíferos

ramificados. No nó da raiz desta seção as reconstruções foram equívocas para todas as 1000 árvores. Na subseção *Sphaerogyni* verifica-se uma distribuição complexa dos diferentes tipos de laticíferos, sendo que, no clado 2, *C. hemiargyreus* possui laticíferos não ramificados e *C. campanulatus* e *C. salutaris* possuem laticíferos ramificados. No clado 1 *C. organensis* e *C. cajucara* possuem laticíferos ramificados, enquanto *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* possuem laticíferos não ramificados. O ancestral comum das espécies da subseção *Spruceani* apresentava laticíferos ramificados, tendo este estado sido reconstruído no nó da raiz desta subseção em 976 árvores (apenas 24 árvores com reconstruções equívocas). Este estado se manteve ao longo da história evolutiva das espécies de *Spruceani* e atualmente a seção como um todo pode ser caracterizada pela presença de laticíferos ramificados. Todas as espécies do grupo externo apresentam o estado plesiomórfico para o gênero que é a presença de laticíferos articulados não ramificados.

Tricomas na superfície abaxial epidérmica (caráter 13, Figura 9): Em *Croton* verifica-se uma complexa distribuição dos tricomas na face abaxial das folhas. Reconstruções equívocas ocorrem no nó da raiz, bem como em toda a espinha dorsal da árvore. Tricomas simples e tricomas estrelados foram reconstruídos como estados ancestrais, uma vez que aparecem, respectivamente, no nó dos ramos terminais de *Astraea lobata* e *Brasiliocroton mamoninha*. Reconstruções equívocas ocorrem no nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas. Em *Croton*, tricomas estrelados na face abaxial das folhas ocorrem em *C. palanostigma* e *C. gnaphalii* (grupo externo) e em *C. sphaerogynus*, *C. fragrans* e *C. spruceanus* (seção *Cleodora*). Apesar da distribuição dos tricomas ser complexa também dentro da seção *Cleodora*, é possível verificar uma tendência dentro de seus clados. Na subseção *Sphaerogyni*, o clado 2 (*C. hemiargyreus* (*C. campanulatus*, *C. salutaris*)) reúne espécies com tricomas lepidotos, caráter compartilhado com as espécies do grupo externo: *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*), *C. pallidulus* (seção *Lamprocroton*) e seção *Cuneati* e com *C. orinocensis* (subseção *Spruceani*, seção *Cleodora*). No nó da raiz do clado 2, tricomas lepidotos foram reconstruídos em 999 árvores. O clado 1 (*C. organensis* (*C. cajucara* (*C. sphaerogynus*, *C. heterocalyx*))), reúne espécies com tricomas multirradiados, com exceção de *C. sphaerogynus*, que possui tricomas estrelados. No nó da raiz deste clado, tricomas multirradiados foram reconstruídos em 914 das 1000 árvores analisadas e em 86 árvores ocorrem reconstruções equívocas. Na subseção *Spruceani* verifica-se que houve uma

tendência evolutiva para a seleção de espécies com tricomas estrelados ou estrelados/simples.

Tricomas na superfície adaxial epidérmica (carácter 14, Figura 9): Em *Croton* verifica-se uma complexa distribuição dos tricomas na face adaxial das folhas. No nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas ocorrem reconstruções equívocas. Tricomas simples/simples com raios suprimidos e tricomas estrelados foram reconstruídos como estados ancestrais, uma vez que ocorrem, respectivamente, em *Astraea lobata* e *Brasilicroton mamoinha*. Em *Croton* verifica-se uma tendência para a evolução de diferentes tipos de tricomas. O clado (*C. sacaquinha* (*C. palanostigma* (*C. gnaphalii*, *C. pallidulus*))) evoluiu a partir de linhagens que possuíam tricomas estrelados, como ilustrado no nó da base do grupo externo, no qual tricomas estrelados foi o estado reconstruído para 485 árvores analisadas e em 515 delas as reconstruções foram equívocas. Tricomas simples na face adaxial volta a ocorrer em *C. pallidulus*. No nó da raiz de *Cleodora* as reconstruções foram equívocas nas 1000 árvores analisadas. Na subseção *Sphaerogyni* são verificadas duas tendências evolutivas: no clado 2, foram selecionadas espécies com tricomas lepidotos, estado compartilhado com espécies da seção *Cuneati* (grupo externo). No clado 1, predominam espécies com tricomas que variam de estrelados a simples (exceto *C. organensis*, que possui tricomas multirradiados). Na subseção *Spruceani* predominam os tricomas que variam de estrelados a simples, tendo este estado sido reconstruído no nó da raiz desta subseção em todas as 1000 árvores analisadas.

Posição dos estômatos (caráter 15, Figura 9): Folhas anfiestomáticas correspondem ao estado ancestral, presentes em *Astraea lobata* e em *Brasilicroton mamoinha*. Este estado foi reconstruído no nó da raiz de 972 das 1000 árvores analisadas e no nó da raiz de *Croton* em 908 das 1000 árvores analisadas (92 árvores apresentaram reconstruções equívocas), mostrando que este é o estado ancestral também em *Croton*. Dentre as espécies do grupo externo, apenas em *C. pallidulus* ocorrem folhas hipoestomáticas. No nó da raiz de *Cleodora* em todas as 1000 árvores analisadas ocorrem reconstruções equívocas para este carácter, evidenciando que os estados são divergentes nesta seção não sendo possível verificar o estado ancestral. De modo geral, verifica-se que houve uma maior tendência evolutiva para a seleção de espécies com folhas hipoestomáticas, uma vez que folhas anfiestomáticas estão presentes apenas no clado 1 da subseção *Sphaerogynus* (exceto *C. heterocalyx*) + *C. billbergianus* (subseção *Spruceanus*).

Tipo de mesofilo (caráter 16, Figura 9): Em *Astraea lobata* e nas espécies de *Croton* as folhas possuem mesofilo dorsiventral, enquanto em *Brasiliocroton mamoinha* o mesofilo é isobilateral. Tanto no nó da raiz da árvore quanto no nó da raiz de *Croton*, mesofilo dorsiventral foi reconstruído como o estado ancestral em todas as 1000 árvores analisadas e este estado se manteve ao longo da evolução de todas as espécies de *Croton* estudadas, como é possível observar nos nós da espinha dorsal da árvore.

Presença de esclereídes no mesofilo (caráter 17, Figura 9): Em *Astraea lobata* e em *Brasiliocroton mamoinha* não foi verificada a presença de esclereídes no mesofilo, já em *Croton* este caráter possui uma distribuição complexa. No nó da raiz da árvore a ausência de esclereídes foi reconstruída para 41 árvores (959 árvores com reconstruções equívocas) e no nó da raiz de *Croton* as reconstruções foram equívocas para todas as 1000 árvores estudadas. Em *Cleodora*, são observadas duas tendências evolutivas: a ausência de esclereídes na subseção *Sphaerogynus* (exceto em *C. heterocalyx*) e a presença de esclereídes na subseção *Spruceani* (exceto em *C. spruceanus*). Entretanto, de modo geral, as reconstruções foram equívocas no nó da raiz de cada uma dessas subseções. Dentre as demais espécies do grupo externo, a presença de esclereídes só não foi verificada em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*).

Organização do feixe vascular (caráter 18, Figura 9): Em *Astraea lobata* os feixes vasculares são bicolaterais contrastando com *Brasiliocroton mamoinha* que possui feixes vasculares colaterais, consequentemente as reconstruções foram equívocas no nó da raiz de todas as 1000 árvores analisadas. Em *Croton* o tipo de feixe apresentado é variável dentre suas espécies, desta forma, as reconstruções no nó de sua raiz foram equívocas em todas as 1000 árvores analisadas. Com relação à distribuição deste caráter só foi possível verificar um padrão na subseção *Spruceani* (seção *Cleodora*), na qual todas as espécies possuem feixes vasculares colaterais. Na subseção *Sphaerogyni* a distribuição é complexa e no clado 2 feixes vasculares colaterais ocorrem em *C. campanulatus* e em *C. salutaris* e no clado 1 em *C. organensis* e *C. sphaerogynus*. Dentre as espécies do grupo externo, feixes vasculares colaterais foram observados em *C. gnaphalli* e em *C. cuneatus* e feixes bicolaterais em *C. sacaquinha* e *C. pallidulus*. Em *C. palanostigma* e em *C. yavitensis* esse caráter foi tratado como “missing data”.

DISCUSSÃO

Análises Filogenéticas: molecular e combinadas (Evidência Total)

Em todas as análises a seção *Cleodora* aparece como monofilética e possui dois clados bem suportados, os quais definem as suas subseções *Sphaerogyni* e *Spruceani*, resultados que estão de acordo com a filogenia molecular (Caruzo *et al.* 2011).

Máxima Parsimônia (MP): A topologia das árvores geradas pelas matrizes A, B e C não são congruentes entre si e o grau de resolução das relações interespecíficas apresenta o seguinte gradiente matriz A < matriz C < matriz B. Este resultado mostra que a inclusão dos caracteres morfológicos nas análises aumenta o número de politomias nas árvores e torna as interrelações filogenéticas entre as espécies confusas. Isto ocorre porque as espécies de *Cleodora* são morfológicamente muito semelhantes (Caruzo 2010) e a morfologia externa não é suficiente para esclarecer as interrelações entre as espécies mais proximamente aparentadas. Por outro lado, os caracteres anatômicos mostraram-se relevantes na resolução da topologia dos ramos internos na seção *Cleodora* (matriz B) e elevam os valores de suporte destes ramos quando comparados com os aqueles plotados na árvore proveniente da filogenia molecular (matriz C).

O clado 1 (subseção *Sphaerogyni*), formado por *Croton sphaerogynus*, *C. cajucara*, *C. organensis* e *C. heterocalyx*, é bem suportado tanto em Evidência Total (matrizes A e B) quanto na filogenia molecular (matriz C), todos com 99% BS, sendo caracterizado pela presença de NEF's com pedúnculo curto ou sésil e superfície secretora convexa ou reta, que são plesiomorfias verificadas neste clado. Na árvore gerada pela matriz A, o posicionamento das quatro espécies que compreendem este clado forma uma politomia, não havendo qualquer tipo de resolução sobre sua interrelação. Nas árvores geradas pelas matrizes B e C, *C.sphaerogynus* e *C. heterocalyx* emergem como espécies irmãs, porém com um baixo suporte (53% BS). A relação confusa entre as espécies do clado 1 é um reflexo da homogeneidade estrutural entre as mesmas. Entretanto, existem alguns caracteres anatômicos que podem esclarecer as interrelações das espécies deste clado através da identificação de caracteres taxonomicamente relevantes: a presença de NEF's baselaminares/acropioclulares sésseis é um caráter exclusivo de *C. cajucara*. Laticíferos articulados não ramificados ocorrem em *C. heterocalyx* e *C. sphaerogynus*, e suporta o posicionamento destas duas espécies como irmãs. Entretanto, *C. heterocalyx* difere das

demais espécies do clado 1 pela ocorrência de folhas hipoestomáticas, idioblastos secretores voltados apenas para a face abaxial e presença de esclereídes conectando os tricomas da face adaxial ao mesofilo e aos feixes vasculares. *Croton heterocalyx* compartilha com *C. hemiargyreus* e *C. salutaris* (clado 2) a presença de folhas hipoestomáticas e idioblastos secretores voltados apenas para a face abaxial.

O clado 2 (subseção *Sphaerogyni*) é constituído por *C. hemiargyreus*, *C. salutaris* e *C. campanulatus* e, diferente do que ocorre para o clado 1, a sua topologia encontra-se bem resolvida tanto em Evidência Total (matrizes A e B) quanto na filogenia molecular (matriz C). A inclusão dos caracteres morfoanatômicos nas análises aumenta o suporte deste clado (75% BS matriz C; 91% BS matriz A; 88% matriz B), mostrando que a presença de NEF's baselaminares/acropeciolaes com pedúnculo longo, folhas hipoestomáticas e tricomas lepidotos são características que justificam uma proximidade filogenética entre suas espécies.

A subseção *Spruceani* é bem suportada nas análises de Evidência Total (matrizes A e B) e de filogenia molecular (matriz C), todas com 99% BS. A subseção *Spruceani* é caracterizada pela presença de tricomas estrelados ou simples, laticíferos articulados ramificados, idioblastos secretores voltados apenas para a face abaxial e folhas com feixes vasculares colaterais. *Croton fragrans* e *C. bilbergianus* foram as primeiras espécies a divergir dentro deste clado e posicionam-se em um ramo à parte das demais espécies desta subseção na árvore gerada pela matriz B. A presença marcante de mais de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes com pedúnculo longo nas folhas de *Croton fragrans* e a presença de folhas hipoestomáticas em *C. bilbergianus* são características que diferem estas espécies das demais circunscritas na subseção *Spruceani*. A inclusão dos caracteres anatômicos na matriz B, sem a influência dos caracteres de morfologia externa, mostraram-se relevantes na resolução da interrelação entre as espécies de *Spruceani*, a qual não está bem resolvida nas árvores geradas pelas matrizes A e C.

A topologia dos ramos terminais da subseção *Spruceani* mostra-se politômica na árvore gerada pela matriz A, evidenciando mais uma vez que a inclusão dos caracteres de morfologia externa mascaram a resolução da interrelação entre as espécies. Apesar da homogeneidade morfológica entre as espécies de *Spruceani*, alguns caracteres anatômicos mostram-se diagnósticos, como a presença de NEF's ao longo da margem das folhas de *Croton orinocensis* e a ausência de esclereídes no mesofilo de *C. spruceanus*.

Em geral, os caracteres morfológicos em *Croton* mostram-se muito homoplásicos, o que justifica o aumento de politomias na árvore quando esses caracteres são incorporados às matrizes anatômicas e moleculares. Em outros grupos taxonômicos, a inclusão de caracteres morfológicos nas análises filogenéticas aumenta o grau de confiança na resolução das relações entre os taxa (Casacov *et al.* 2009; Mello-Silva *et al.* 2011; Bello *et al.* 2012).

Inferência Bayesiana: A seção *Cleodora* é altamente suportada como grupo monofilético, resultado que está de acordo com Caruzo *et al.* (2011). Este clado possui duas principais sinapomorfias morfológicas: sépalas das flores pistiladas com algum tipo de sobreposição e estiletes unidos até a base ou acima desta (Caruzo *et al.* 2011) e, anatomicamente, compartilham a presença de pelo menos um par de NEF's baselaminares/acropetiolares, coléteres marginais, estômatos paracíticos, mesofilo dorsiventral, laticíferos articulados, idioblastos secretores e ausência de tricomas secretores. A ocorrência conjunta desses caracteres anatômicos auxilia a delimitação da seção *Cleodora* e contribui para que a monofilia desta seção seja mantida nas análises de Evidência Total (matrizes A e B).

As árvores consenso resultantes de IB são congruentes com aquelas geradas pelas análises de MP. Nestes dois tipos de análise, as árvores geradas pela matriz A mostraram politomias nos mesmos ramos, indicando que a inclusão dos caracteres de morfologia externa nas análises reduz o grau de resolução dos ramos e mascaram as relações interespecíficas em *Croton*. Este é o caso do clado definido por *C. organensis*, *C. cajucara*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx*, o que se constitui num forte indício de que estas espécies são proximamente relacionadas e que os caracteres morfológicos, por serem muito homoplásicos, não são capazes de definir as relações filogenéticas entre as mesmas. Por outro lado as árvores geradas pela matriz B são topologicamente semelhantes àquelas geradas pela matriz C, mostrando que muitos dos caracteres anatômicos utilizados são diagnósticos para determinados clados ou espécies e contribuem com uma melhor interpretação das relações entre as espécies de *Croton* e esclarecem a história evolutiva das mesmas. A ocorrência de laticíferos articulados não ramificados em *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* é um interessante exemplo de proximidade filogenética entre estas duas espécies e ilustra como a anatomia vegetal pode subsidiar a filogenia molecular.

Os caracteres de morfologia interna e externa têm demonstrado grande contribuição nas análises filogenéticas (Horn *et al.* 2009; Mello-Silva *et al.* 2011;

Nishida & Werff 2011; Horn *et al* 2012; Mantovani *et al* 2012; Zhou & Xia 2012; Chin *et al* 2013). O uso de dados morfológicos e moleculares em conjunto nas análises filogenéticas proporciona resultados mais confiáveis do que se cada um destes dados for utilizado separadamente (Maddison 1996). Em seu trabalho, Bello *et al* (2012) mostraram que a exclusão dos dados moleculares ou morfológicos das análises de MP e IB resultam em árvores com menor resolução e suporte. A utilização apenas de dados moleculares proporcionou um baixo suporte para as relações interfamiliares de Fabales sob MP e IB (Bello *et al* 2009). Estes exemplos tornam clara a importância da análise combinada, sempre que possível, dos dados morfológicos e moleculares nas análises filogenéticas. A inclusão de uma matriz morfológica pode resultar em mudanças do posicionamento das taxa mesmo quando a matriz molecular fornece um número muito superior de dados (Wiens *et al* 2010). Além disso, análises combinadas podem melhorar as estimativas através do aumento do número de caracteres informativos, revelando grupos que não são vistos nas árvores geradas somente por dados moleculares ou morfológicos (Chippindale & Wiens 1994). As matrizes anatômicas fazem parte destes dados morfológicos e, como demonstrado no presente trabalho, contribuem com uma melhor resolução das relações interespecíficas. Desta forma, a anatomia vegetal, assim como a morfologia externa, apresenta um grande potencial nos estudos de filogenia. A identificação de caracteres diagnósticos para espécies ou grupo de espécies de um mesmo clado é essencial para a compreensão da história evolutiva dos mesmos. Informações sobre a morfologia e/ou anatomia dos órgãos vegetativos podem esclarecer eventos de radiação, especialmente em *Croton*, gênero no qual os caracteres florais são altamente conservados.

Reconstrução do Estado Ancestral

Idioblastos secretores voltados para a face abaxial e Tricomas secretores (Caracteres 1, 2 e 3): Os tricomas secretores em *Croton*, quando presentes, ocorrem somente na epiderme da face abaxial. Os idioblastos secretores em *Croton* podem ocorrer voltados apenas para a face adaxial, apenas para a abaxial ou voltados para ambas as faces. A otimização dos caracteres em *Croton* mostra que a presença de idioblastos secretores voltados para a face abaxial e a presença de tricomas secretores são mutuamente excludentes; estas estruturas são homólogas, confirmando a hipótese sugerida por Vitarelli (2013, Cap. II). Idioblastos secretores voltados para a face abaxial correspondem ao estado ancestral e, ao longo da história evolutiva de algumas linhagens

de *Croton*, deram origem aos tricomas secretores. Este é o caso de espécies pertencentes às seções *Lamprocroton* e *Lasiogyne*. Em *Cleodora*, as espécies da subseção *Spruceani* e *C. heterocalyx* (subseção *Sphaerogyni*) mostram claramente um estado transitório entre idioblastos secretores e tricomas secretores e podem ser consideradas como espécies-chave que ilustram a história evolutiva das estruturas secretoras em *Croton*. Estes resultados confirmam as hipóteses discutidas por Vitarelli (2013, Cap. II), sendo a presença de idioblastos secretores voltados para a face abaxial das folhas um caráter plesiomórfico compartilhado por *Brasiliocroton mamoinha* e pela maioria das espécies de *Croton*. A presença de tricomas secretores é um caráter sinapomórfico em *Croton* compartilhado por espécies das seções *Lamprocroton* e *Lasiogyne*. Webster (1996) relata a presença de tricomas secretores também nas seções *Barhamia* e *Adenophyllum* (*sensu* Webster 1993) o que sugere que este caráter deva ser considerado em análises futuras para verificar importância desta característica em *Croton*.

Os idioblastos e os tricomas secretam compostos lipídicos (Vitarelli, 2013, Cap. II), o que é mais uma evidência da homologia dessas estruturas. Os resultados do presente trabalho confirmam a hipótese (Vitarelli, 2013, Cap. II) de que em *Croton* houve uma transferência do armazenamento dos metabólitos secundários de estruturas internas (idioblastos secretores no mesofilo) para estruturas externas (tricomas secretores na epiderme). É possível que, em um primeiro momento, a retenção dos metabólitos secundários nos idioblastos secretores se constituía num mecanismo interno de defesa das plantas e que, em algumas linhagens de *Croton*, a externalização destes metabólitos em tricomas secretores permitiu uma maior vantagem adaptativa relacionada com possíveis novas interações ecológicas adquiridas.

Presença de coléteres (em folhas completamente expandidas – caráter 4 e nos primórdios foliares – caráter 5): Coléteres foliares constituem um caráter compartilhado por *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton*. Estes gêneros proximamente relacionados provavelmente evoluíram a partir de um ancestral comum que possuía coléteres foliares. A presença de coléteres nestes três gêneros sugere que este caráter seja uma sinapomorfia para a tribo Crotoneae, para confirmar esta hipótese é importante investigar se coléteres ocorrem nas espécies dos demais gêneros da tribo, *Acidocroton*, *Sagotia*, *Sandwithia* e *Ophellantha*.

De Paula *et al* (2010) afirmam que a presença de coléteres florais em *Astraea* e a ausência dessas estruturas nas flores de *Croton* é um importante caráter na distinção desses gêneros proximamente relacionados. Os resultados do presente trabalho mostram

que para órgãos vegetativos, a presença de coléter é um caráter que aproxima ainda mais *Astraea* e *Croton*. Estruturas morfológicamente semelhantes aos coléteres são descritas nas flores de *Croton* (De Paula *et al.* 2010), porém foram denominadas como estruturas filamentosas secretoras homólogas às pétalas. A primeira descrição de coléteres em *Croton* foi feita por Vitarelli (2013, Cap. II), que afirma que a ausência de registros da ocorrência de coléteres no gênero pode ser devido a problemas de interpretação, e ressalta que existe uma grande semelhança entre estruturas denominadas como nectários (Freitas *et al.* 2001; Sá-Haiad *et al.* 2009) e os coléteres descritos para *Croton*. Cabe ressaltar que este caráter deve ser avaliado cautelosamente, uma vez que os coléteres podem ser caducos na maturidade das folhas, sendo importante a análise dos primórdios foliares no meristema apical caulinar.

Dentro da ordem Malpighiales (APGII 2003), a presença de coléteres é relatada em Euphorbiaceae, Erythroxylaceae, Passifloraceae, Rhizophoraceae, Turneraceae (Thomas 1991) e em Caryocaraceae (Paiva & Machado 2006). Acredita-se que a presença de coléteres foliares seja um caráter diagnóstico para *Croton*. Em *C. gnaphalii* estas estruturas parecem ter sido perdidas. O fato de coléteres não terem sido observados nesta espécie pode ter sido proveniente de um erro amostral (como evidenciado por Vitarelli, 2013, Cap. II) e novas investigações, compreendendo outras espécies da seção *Lamprocroton* e representantes das demais seções de *Croton*, se fazem necessárias para confirmar este caráter como um marcador estrutural para *Croton*.

Presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciulares (caráter 6): A ausência de um par de NEF's baselaminares/acropeciulares é o caráter ancestral para todo o grupo estudado, uma vez que este estado foi reconstruído em *Astraea lobata*. É possível que NEF's baselaminares/acropeciulares tenham surgido no ancestral compartilhado por *Brasiliocroton* e *Croton*, sendo este estado uma possível sinapomorfia entre *Brasiliocroton* e *Croton* e que, em alguns clados dentro de *Croton*, a perda deste caráter constitui-se numa reversão ao estado ancestral. Como ocorre em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*), *C. gnaphalii* e *C. pallidulus* (Seção *Lamprocroton*).

Os resultados obtidos não suportam uma homologia entre Coléteres e NEF's em *Croton*, porém é possível que exista uma correlação evolutiva no posicionamento destas estruturas. Em *Astraea lobata* coléteres estão presentes não apenas na margem da lâmina foliar, mas ocorrem também em conjunto na região baselaminar/acropeciolar, mesma posição ocupada pelos NEF's em *Brasiliocroton mamoinha* e em *Croton*. É

possível que nestes dois gêneros, ao longo do processo evolutivo, os coléteres baselaminares/acropeciolaes tenham sido substituídos pelos NEF's, estruturas morfológicamente mais complexas, e os coléteres ficaram restritos à margem das folhas. Em alguns clados, como nas seções *Lamprocroton* e *Lasiogyne*, a pressão de seleção foi no sentido da perda de estruturas secretoras baselaminares/acropeciolaes, não sendo observados coléteres ou NEF's nesta região da folha. Na seção *Cuneati* e em *C. orinocensis* (subseção *Spruceani*, seção *Cleodora*), NEF's ocorrem ao longo da margem das folhas alternados com os coléteres, indicando uma condição derivada. Entretanto, a real função da ocorrência concomitante destas duas estruturas secretoras nesta posição ainda é desconhecida. São necessários estudos complementares visando elucidar se existe uma assincronia na fase secretora destas estruturas, podendo os coléteres estarem ativos em fases iniciais do desenvolvimento das folhas e os nectários em fase posterior. A presença de coléteres está intimamente relacionada com a proteção dos tecidos foliares durante o seu desenvolvimento (Lersten & Horner 1968; Lersten 1974; Fahn 1979) devido a secreção de uma substância que lubrifica a superfície foliar e ameniza o atrito dos tecidos em formação e evita a dessecação dos mesmos (Solereder 1908). Já os NEF's estão comumente relacionados com a atração de visitantes que utilizam o néctar como recurso e protegem as folhas já completamente formadas contra herbivoria, sendo esta uma interação de reconhecido valor adaptativo para as plantas (Roshchina & Roshchina 1993; Morellato & Oliveira 1994).

Comprimento do pedúnculo e forma dos NEF's baselaminares/acropeciolaes (Caráteres 7 e 8): Embora não tenham sido feitos testes específicos, é evidente a íntima correlação evolutiva entre os caracteres 8 e 9. Verifica-se duas tendências para a evolução da estrutura dos NEF's: aqueles que apresentam pedúnculo curto possuem superfície secretora convexa ou reta com margem elevada e aqueles que apresentam pedúnculo longo possuem superfície secretora côncava. NEF's com pedúnculo curto e superfície secretora convexa constituem o estado ancestral em *Croton*, o qual é verificado também em *Brasiliocroton*. Dentro da seção *Cleodora* verifica-se uma divergência evolutiva marcante em seus clados. Na subseção *Sphaerogyni* as espécies do clado 1 mantiveram os NEF's com pedúnculo curto e superfície secretora convexa, enquanto nas espécies do clado 2 evoluíram os NEF's com pedúnculo longo e superfície secretora côncava, sendo este o estado uma sinapomorfia, embora homoplástica, para o grupo. Na subseção *Spruceani*, as espécies mantiveram os NEF's com pedúnculo curto

e superfície secretora convexa, tendo os NEF's com pedúnculo longo e superfície secretora côncava evoluído independentemente apenas em *C. fragrans*.

A morfologia dos nectários está intimamente relacionada com as interações ecológicas destas estruturas com os animais visitantes e coletores de néctar (Bentley & Elias 1983; Roshchina & Roshchina 1993, Baker & Baker 1990). Provavelmente, em algum momento da história evolutiva de *Croton*, linhagens distintas passaram a apresentar interações ecológicas divergentes, aparentemente com a mesma vantagem adaptativa, de modo que as duas estratégias foram selecionadas e atualmente verificam-se dois padrões morfológicos para os NEF's em *Croton*. Sendo que NEF's com pedúnculo curto e superfície convexa ou reta constituem o estado ancestral e NEF's com pedúnculo longo e superfície secretora côncava constituem uma sinapomorfia para as espécies do clado 2 (subseção *Sphaerogyni*), a qual surgiu também de forma independente em *C. fragrans* (subseção *Spruceani*) na seção *Cleodora*.

Presença de NEF's na margem da lâmina foliar (caráter 9) e na superfície da lâmina foliar (caráter 10): A ausência de NEF's na margem das folhas e na superfície da lâmina foliar foi verificada em *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton* e se constituem no estado ancestral em *Croton* e são simplesiomorfias para este gênero. A presença de NEF's ao longo da margem das folhas foi verificada apenas em *C. orinocensis* (seção *Cleodora*) e em *C. cuneatus* (seção *Cuneati*). As espécies destas duas seções são morfológicamente similares, apresentam hábito arbóreo, número de estames reduzidos (10-20) e címulas bissexuais podem estar presentes (Caruzo *et al.* 2011). Alguns caracteres morfológicos são utilizados para distinguir as espécies destas duas seções e, dentre estes, um dos mais relevantes é a ocorrência de glândulas discóides nas margens das folhas, as quais estão presentes nas espécies da seção *Cuneati* e ausentes em *Cleodora* (Caruzo *et al.* 2011). Essa denominação “glândulas discóides” refere-se aos NEF's que ocorrem nas margens das folhas. O registro de NEF's marginais tanto nas folhas de *C. orinocensis* (seção *Cleodora*) como nas folhas de *C. cuneatus* (seção *Cuneati*) mostra que a presença ou ausência destas estruturas nas margens das folhas não é um caráter seguro para separar espécies de *Cleodora* e *Cuneati*. A seção *Cuneati* compartilha algumas características morfológicas com as seções *Geiseleria* e *Corylocroton*, como a presença de glândulas marginais. Este estado de caráter se constitui numa sinapomorfia e não indica necessariamente uma proximidade filogenética entre essas seções (Riina *et al.* 2010), acredita-se que glândulas marginais (as quais podemos interpretar no presente trabalho como NEF's marginais) evoluíram

de forma independente em *Croton* (Van Ee *et al.* 2008; Riina *et al.* 2010), constituindo-se num caráter homoplástico neste gênero.

A presença de NEF's na superfície da lâmina foliar de *Croton palanostigma* está de acordo com o relatado por Riina *et al.* (2010) para a seção *Luntia*. Estes autores registram duas tendências evolutivas dentro desta seção para a morfologia foliar, a primeira constitui-se de espécies com folhas não lobadas, com venação pinada e sem glândulas na lâmina foliar e a segunda constitui-se de espécies com folhas profundamente lobadas, palmatinérvias e com glândulas pateliformes (morfologicamente semelhantes aos NEF's observados no presente trabalho) em ambas as superfícies da lâmina foliar. A presença de NEF's na superfície da lâmina foliar é um caráter apomórfico em *Croton*, verificado até o momento, apenas neste segundo grupo de *Luntia*.

Laticíferos (caracteres 11 e 12): A presença de laticíferos articulados é uma plesiomorfia para *Croton*, tendo sido verificada também em *Brasiliocroton* e *Astraea* e registrados por Vega *et al.* (2002) na tribo Galphimeae (Malpighiaceae). O tipo de laticífero mais comum dentre as eudicotiledoneas é o não articulado (Rudall 1994). Esta autora sugere que os laticíferos articulados tenham evoluído a partir dos não articulados. Porém, o registro de laticíferos articulados em *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea* (tribo Crotoneae, Euphorbiaceae), bem como na tribo Galphimeae (Malpighiaceae) indica que na ordem Malpighiales os laticíferos não articulados possam ter evoluído a partir dos articulados. A tendência mais natural é de que as paredes terminais dos laticíferos articulados sofram dissolução e dêem origem aos laticíferos não articulados, os quais formam uma estrutura tubular interligada, e não o contrário. Isto ocorre durante o desenvolvimento dos laticíferos articulados de *Mandevilla atrovioleaceae* (Apocynaceae), os quais na maturidade podem ser confundidos com não articulados (Lopes *et al.* 2009).

A otimização dos tipos de laticíferos mostra que em *Croton* o estado ancestral é a presença de laticíferos articulados não ramificados, caráter que se mantém em todas as espécies do grupo externo. Porém, na seção *Cleodora* o tipo predominante é o articulado ramificado, excetuando *C. hemiargyreus*, *C. sphaerogynus* e *C. heterocalyx* (subseção *Sphaerogyni*). Verifica-se, portanto, que a presença de laticíferos articulados ramificados é uma sinapomorfia homoplástica para as demais espécies da subseção *Sphaerogyni* e todas da subseção *Spruceani*.

Tricomas na superfície foliar (caracteres 13 e 14): Tricomas simples na superfície das folhas é o estado ancestral, tendo sido verificado em *Astraea lobata*. *Croton* e *Brasiliocroton* provavelmente evoluíram de um ancestral comum que possuía tricomas estrelados nas folhas. Este caráter parece ser o estado ancestral dentro de *Croton* e se constitui numa plesiomorfia para o gênero. Na maioria das espécies da seção *Cleodora* verifica-se a ocorrência concomitante de tricomas estrelados e simples. Em *Croton*, os tricomas simples parecem ter originado a partir dos estrelados, como observado em *C. pallidulus*, espécie na qual se verifica, além dos tricomas simples, os tricomas simples com raio suprimido, um estado transitório entre tricomas estrelados e simples. Já a presença de tricomas lepidotos é interpretada como uma sinapomorfia em *Croton*. Os tricomas multirradiados aparecem como sinapomorfia para o clado 1 da subseção *Sphaerogyni* em *Cleodora*. Estes resultados confirmam a proposta de evolução dos tipos de tricomas em *Croton* (Webster *et al* 1996), na qual os tricomas estrelados aparecem como estado ancestral e dão origem aos tricomas simples pela supressão dos raios laterais; aos tricomas lepidotos, pela união em grau cada vez maior dos raios laterais, juntamente com a redução do raio porrecto; e aos tricomas multirradiados e dendríticos, pelo aumento de raios laterais em diferentes alturas ao longo de um pedúnculo.

Os tricomas descritos como adpresso-estrelados por Caruzo *et al.* (2011), subtipos de lepidotos (Webster *et al* 1996), para as espécies da subseção *Spruceani* + *C. sphaerogyni* correspondem aos descritos no presente trabalho como estrelados (Caruzo, comunicação pessoal). Esta divergência pode ter decorrido dos problemas de interpretação das descrições apresentadas por Webster *et al* (1996).

Posição dos estômatos (caráter 15): Em *Croton* folhas anfiestomáticas constituem o estado ancestral e em *Cleodora* este estado ocorre em apenas algumas espécies, sendo que a presença de folhas hipoestomáticas foi observada na maioria das espécies desta seção e parece ser o estado sinapomórfico para *Cleodora*. Folhas anfiestomáticas também foram observadas em 9 espécies de *Croton* (seção *Cyclostigma sensu* Webster 1993), em *Brasiliocroton mamoninha* e em 4 espécies de *Astraea* estudadas (Sá-Haiad *et al.* 2009).

Tipo de organização do mesofilo (caráter 16): Mesofilo dorsiventral é um caráter simplesiomórfico em *Croton* e parece ser o tipo mais comum dentre as suas espécies. Entretanto, estudos que avaliem um maior número de espécies, com maior representatividade das seções do gênero, são necessários para confirmar tal hipótese.

Mesofilo dorsiventral foi observado nas 10 espécies de *Croton* seção *Cyclostigma* sensu Webster (1993) estudadas por Sá-Haiad *et al.* (2009).

Presença de esclereídes no mesofilo (caráter 17): Em *Croton* a presença de esclereídes é um caráter homoplástico e não foi possível verificar qual é o estado ancestral no gênero. Para esclarecer a história evolutiva do desenvolvimento de esclereídes em *Croton* sugere-se um estudo mais abrangente avaliando mais espécies e ampliando o número de seções investigadas. Possivelmente, a evolução das esclereídes em *Croton* está relacionada com a vantagem adaptativa em resposta a ambientes com restrição hídrica. As esclereídes em *Croton* formam uma estrutura complexa com os tricomas tectores, possivelmente atuando na absorção de água da umidade atmosférica (Vitarelli, 2013, Cap. I).

Não foi possível estabelecer uma relação entre presença de esclereídes e tipo de tricomas nas folhas. Entretanto, a presença de esclereídes está relacionada com a presença de tricomas na superfície adaxial epidérmica das folhas, podendo estar associadas aos tricomas simples, estrelados ou lepidotos.

A presença de esclereídes atravessando o mesofilo de *Croton* já foi relatada na literatura (Metcalf & Chalk 1950; Appezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2006), porém ainda sem um enfoque evolutivo ou ecológico. Rudall (1994) sugere uma provável homologia entre esclereídes e laticíferos em Crotonoideae, uma vez que as esclereídes estão presentes geralmente quando os laticíferos estão ausentes. A autora ressalta que esclereídes e laticíferos são semelhantes em estrutura e distribuição, ambos são células alongadas e comumente associadas com tecidos vasculares e com a epiderme, sendo em muitos casos difícil a distinção entre essas duas estruturas. Entretanto, no presente estudo não foi verificada uma correlação entre a presença de esclereídes e ausência de laticíferos, uma vez que os laticíferos ocorrem em todas as espécies estudadas e esclereídes distribuem-se de forma independente nos diferentes clados de *Croton*.

Organização do feixe vascular (caráter 18): Os tipos de feixes vasculares possuem uma distribuição complexa em *Croton*, não sendo possível verificar qual é o estado ancestral para o gênero, sendo este caráter é muito homoplástico e de pouca relevância filogenética.

CONCLUSÕES

Os caracteres anatômicos foliares, em especial as estruturas secretoras, contribuem com o esclarecimento da história evolutiva das diferentes linhagens de *Croton* e esclarecem interrelações entre as suas espécies. Os caracteres anatômicos mostraram-se relevantes na resolução da topologia dos ramos internos na seção *Cleodora* e elevam os valores de suporte destes ramos, contribuindo com o esclarecimento acerca das relações entre as espécies desta seção.

A homologia entre idioblastos secretores e tricomas secretores em *Croton* foi confirmada, tendo este último evoluído a partir da modificação estrutural dos idioblastos, aparentemente mantendo os metabólitos secundários produzidos. Os tricomas secretores são, portanto, caracteres apomórficos compartilhados por poucos clados de *Croton*, como por exemplo a seção *Lamprocroton*.

Coléteres foliares foram observados em todas as espécies estudadas, com exceção de *Croton gnaphalii*, e constituem um caráter plesiomórfico em *Croton*, o qual está presente também em *Astraea* e *Brasiliocroton*.

A presença de NEF's baselaminares/acropetiolares é um estado ancestral em *Croton*, sendo observado na maioria das espécies estudadas. A evolução destas estruturas demonstraram duas tendências: aquelas que apresentam pedúnculo curto possuem superfície secretora convexa ou reta com margem elevada e aquelas que apresentam pedúnculo longo possuem superfície secretora côncava. A presença de NEF's com pedúnculo curto e superfície secretora convexa constitui o estado ancestral em *Croton* e NEF's com pedúnculo longo e superfície secretora côncava constituem-se numa sinapomorfia para o clado 1 da subseção *Sphaerogyni*, embora homoplástica.

A presença de NEF's nas margens e na superfície da lâmina foliar são sinapomorfias em *Croton* e parecem constituir também homoplasias dentro deste gênero.

A presença de laticíferos articulados é uma simplesiomorfia em *Croton* e ocorre também em *Brasiliocroton* e *Astraea*. Em *Croton*, os laticíferos articulados não ramificados constituem o estado ancestral.

Croton exibe uma grande diversidade de tricomas os quais evoluíram a partir de modificações estruturais dos tricomas do tipo estrelado. Por outro lado, o tipo de mesofilo parece ser um caráter pouco variável no gênero, predominando a organização dorsiventral, a qual constitui o estado ancestral.

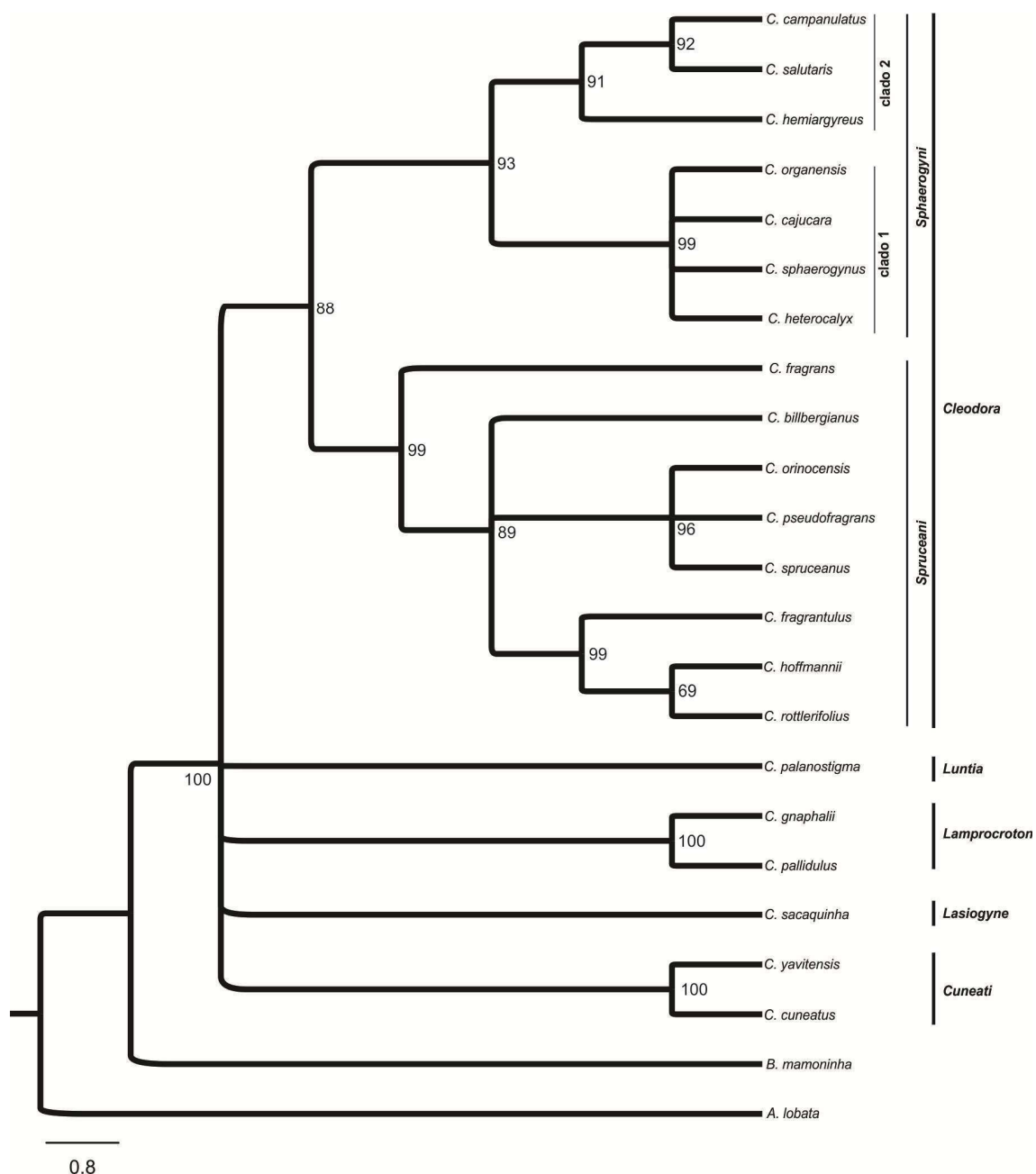


Figura 1. Árvore consenso gerada a partir da análise combinada dos dados moleculares, morfológicos e anatômicos (Matriz A) em Máxima Parcimônia. Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap que foram plotados na árvore consenso.

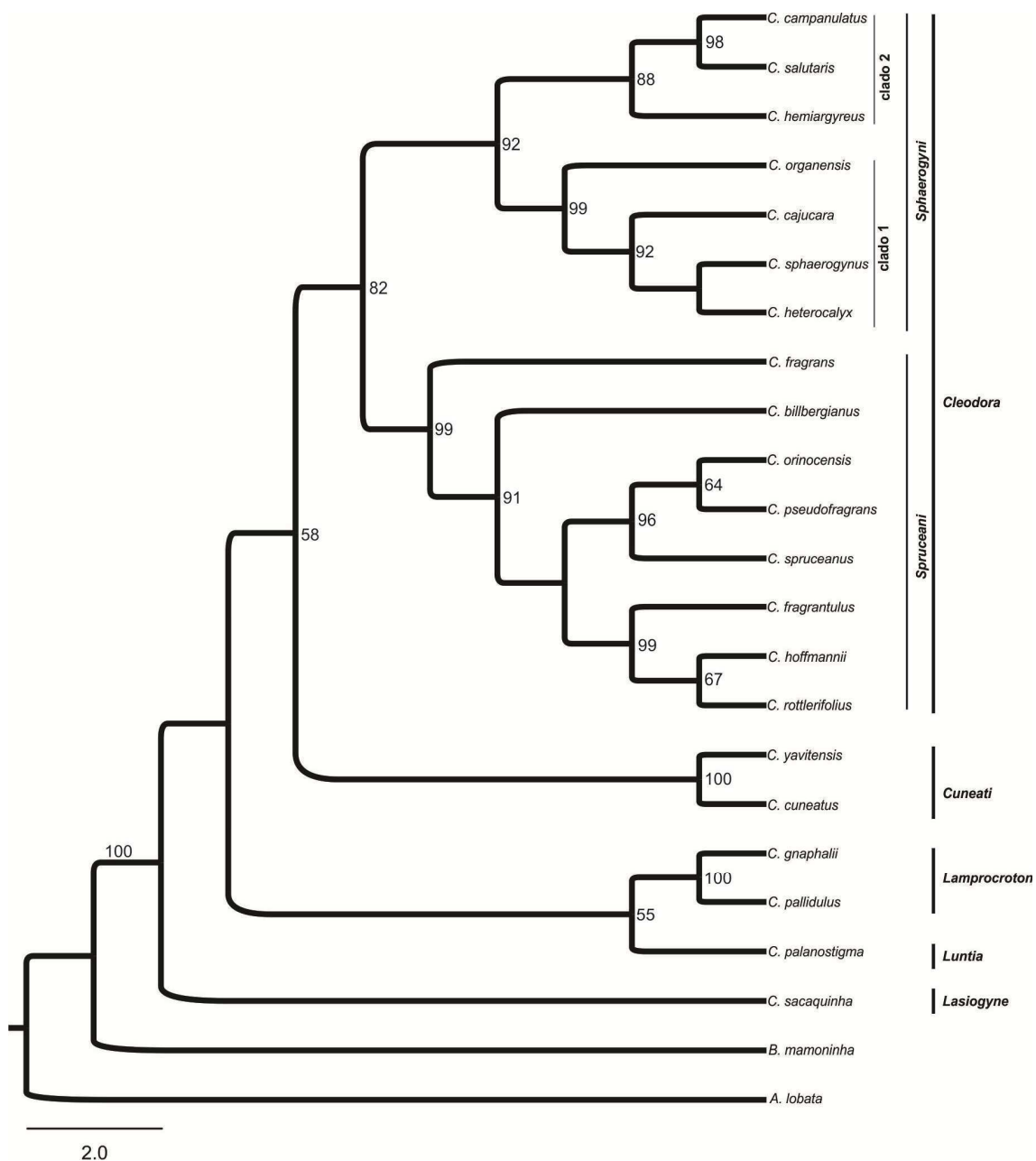


Figura 2. Melhor árvore escolhida a partir da análise combinada dos dados moleculares e anatômicos (Matriz B) em Máxima Parcimônia. Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap que foram plotados na árvore consenso.

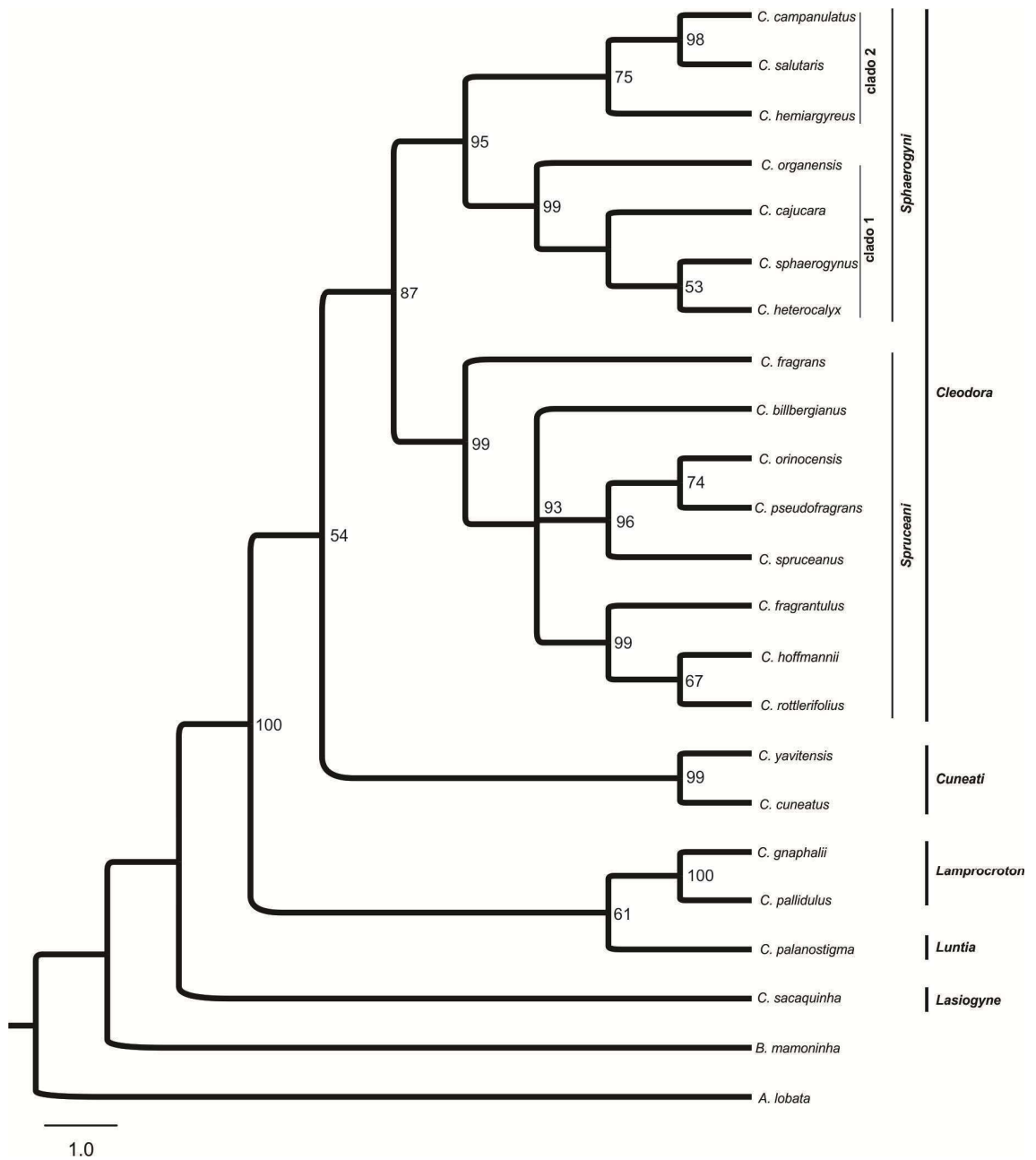


Figura 3. Árvore consenso gerada a partir dos dados moleculares (Matriz C) em Máxima Parcimônia. Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap que foram plotados na árvore consenso.

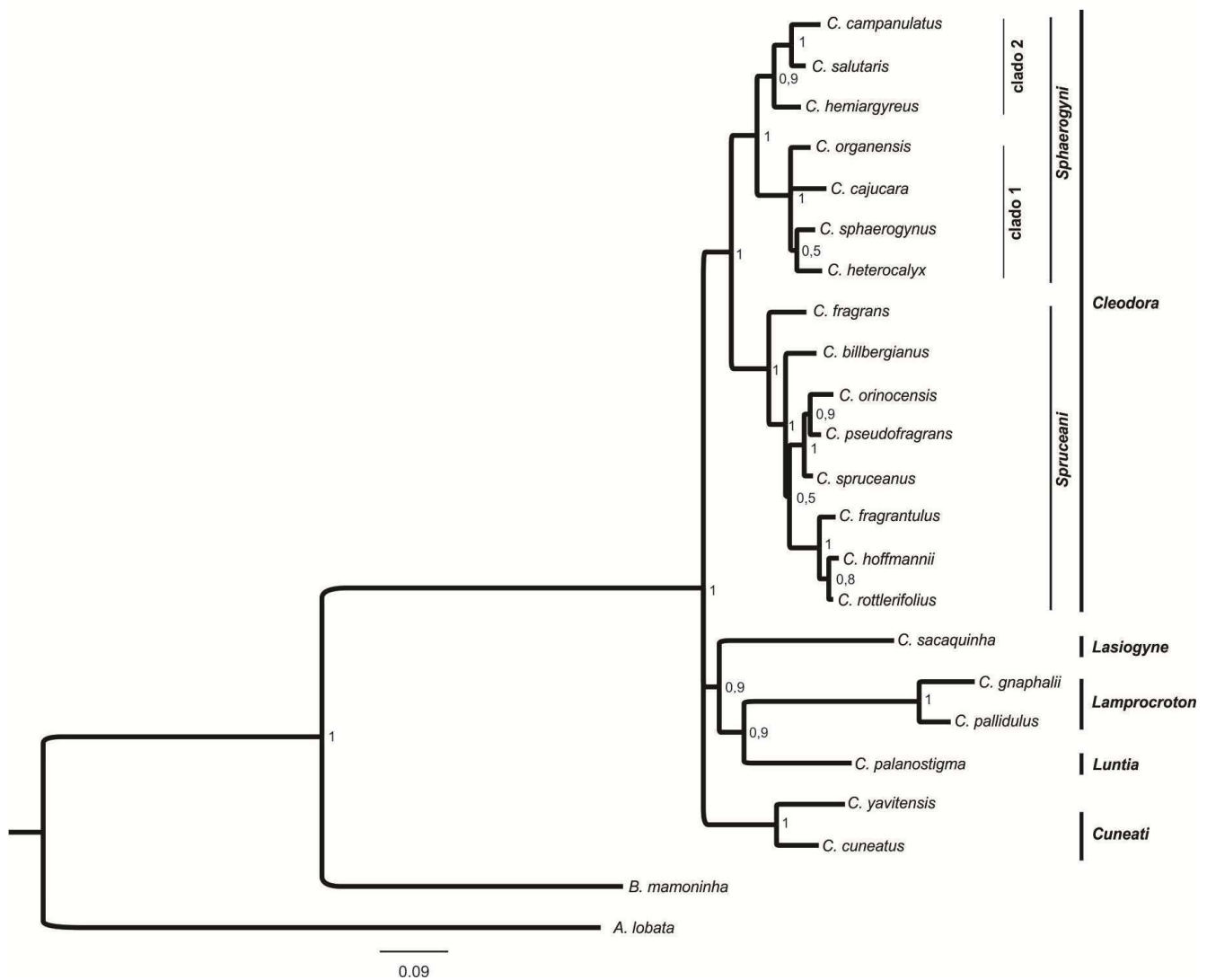


Figura 4. Árvore consenso gerada a partir da análise combinada dos dados moleculares, morfológicos e anatômicos (Matriz A) em Inferência Bayesiana. Os números em cada nó são referentes aos valores de posterior probability plotados na árvore consenso.

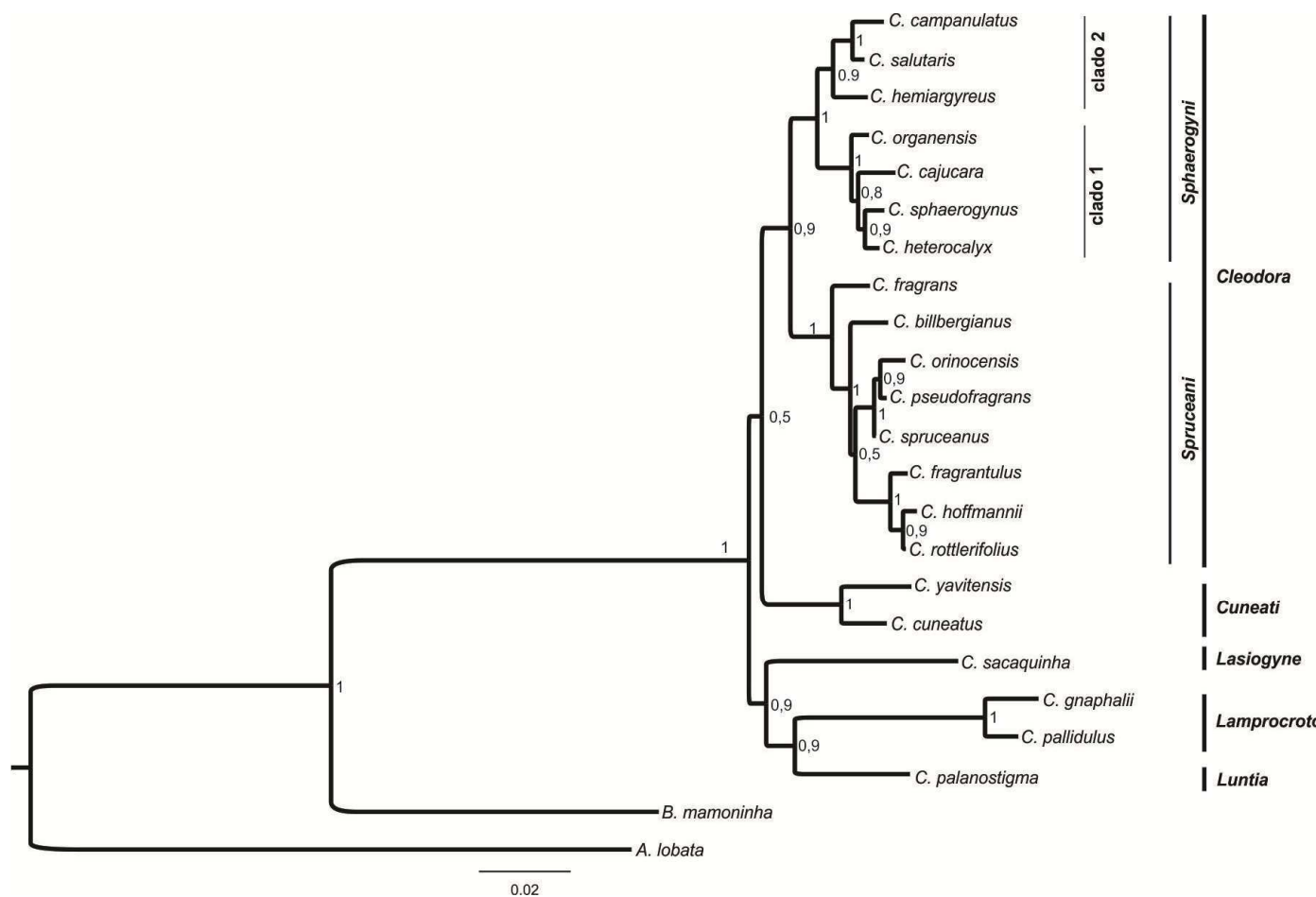


Figura 5. Árvore consenso gerada a partir da análise combinada dos dados moleculares e anatômicos (Matriz B) e a partir da análise dos dados moleculares (Matriz C) em Inferência Bayesiana. Os números em cada nó são referentes aos valores de posterior probability (PP) plotados na árvore consenso. A topologia das árvores geradas pelas matrizes B e C é a mesma e seus ramos apresentam os mesmos valores de PP.

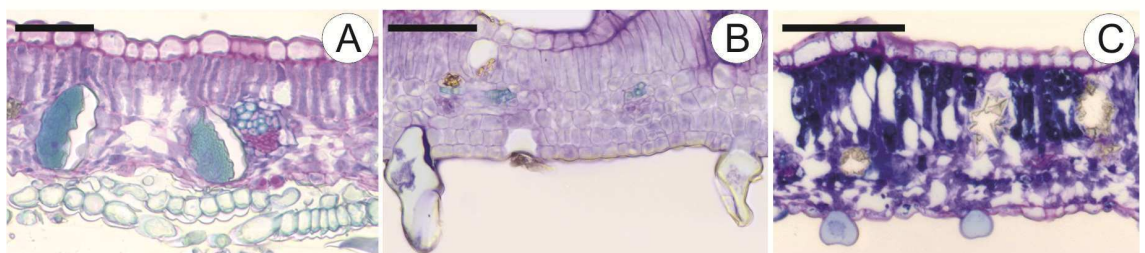
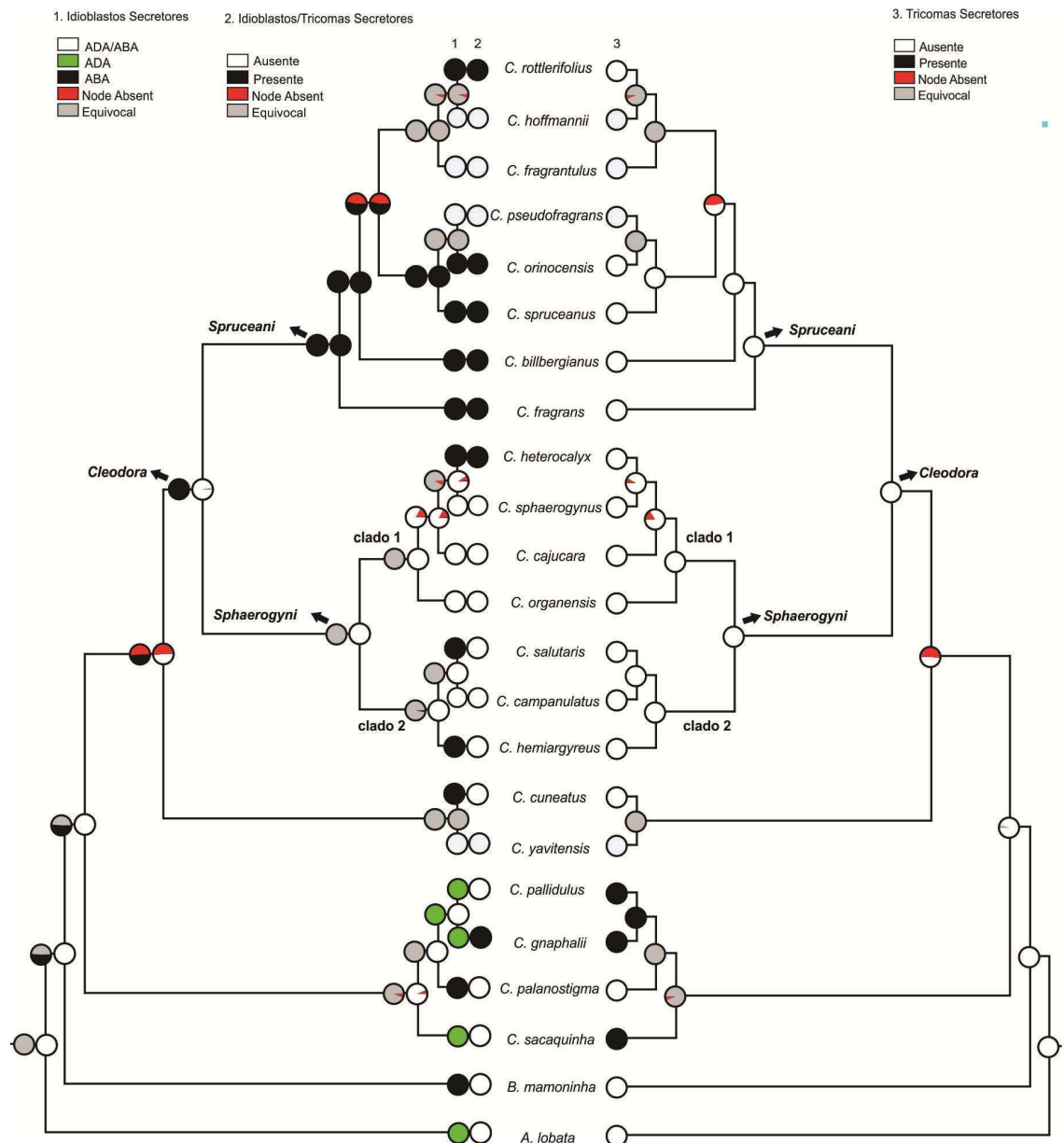


Figura 6. Reconstrução do estado ancestral para (1) Idioblastos secretores, (2) Idioblasto Secretor/Tricoma Secretor e (3) Tricomas Secretores, em *Croton* seção *Cleodora* e grupo externo. O estado ancestral para cada caráter foi estimado usando otimizações de verossimilhança nas 1000 árvores selecionadas após ‘burn in’ das análises de Inferência Bayesiana a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram. Figuras 6A, 6B e 6C, seções transversais de folhas incluídas em resina e coradas com azul de toluidina. A. *C. hemiargyreus*, B. *C. fragrans* e C. *C. gnaphalii*. Barras: 50µm

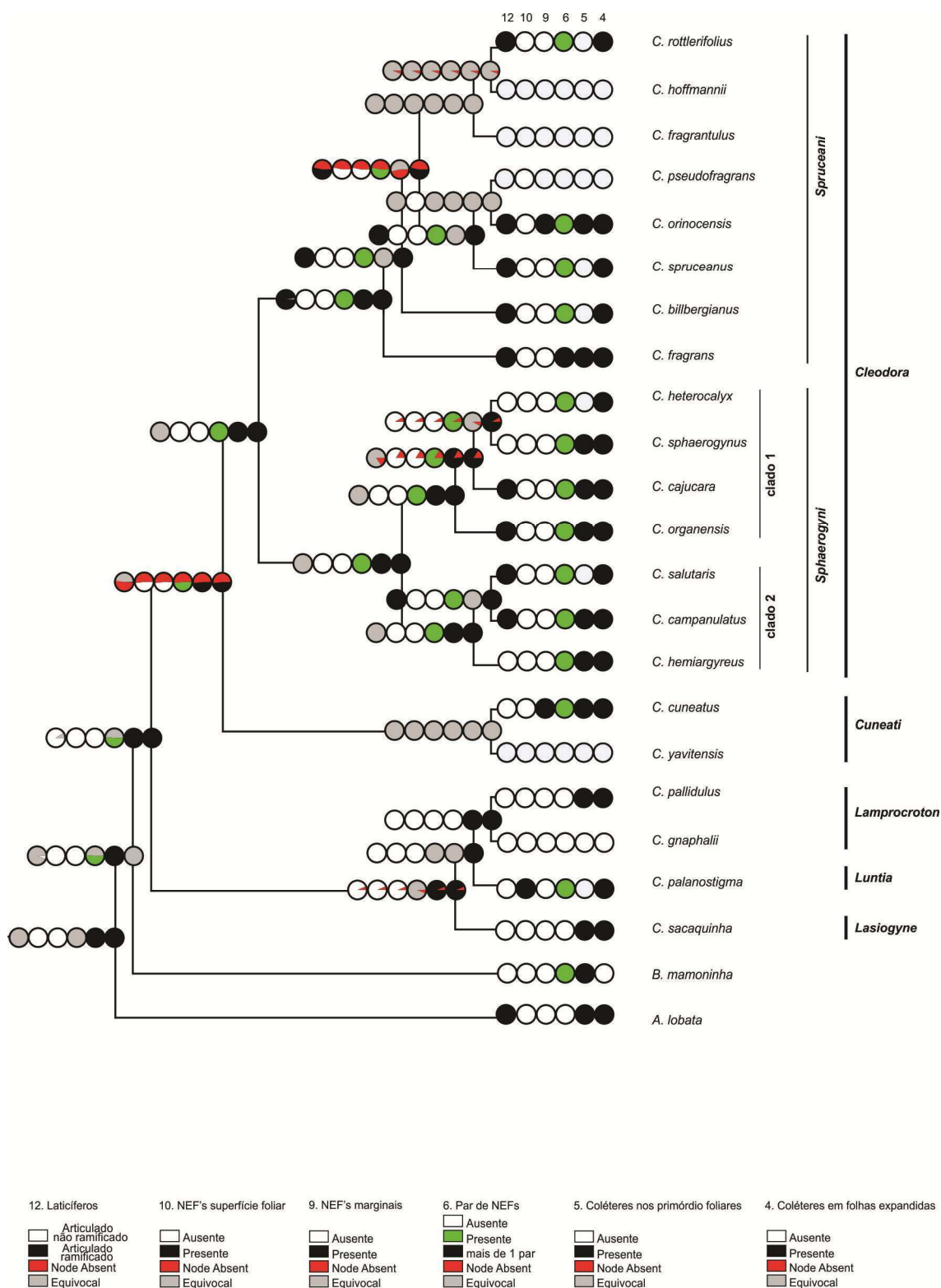
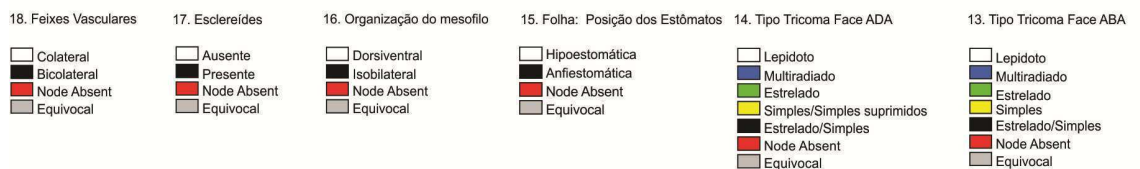
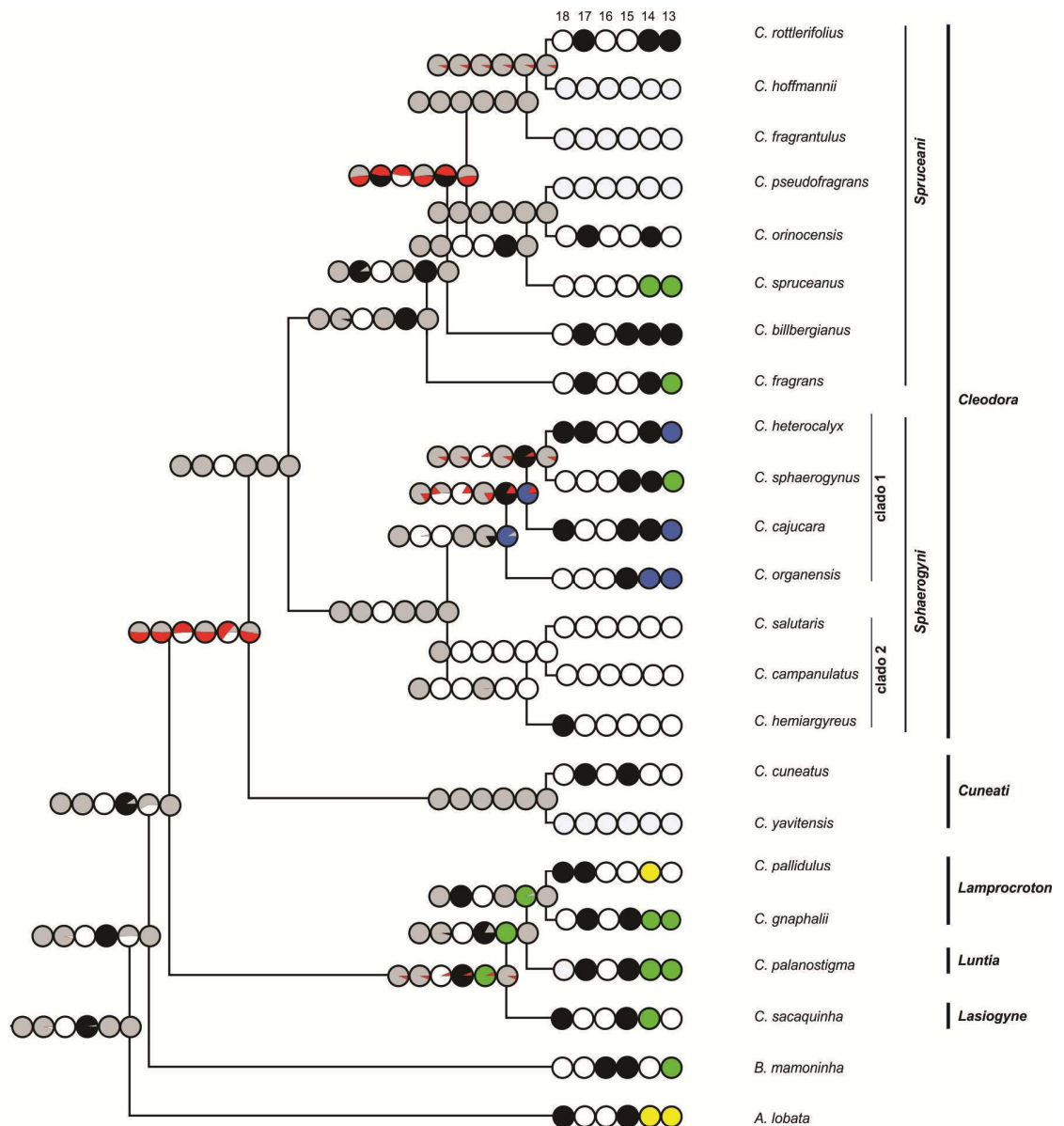


Figura 7. Reconstrução do estado ancestral para (4) Coléteres em folhas expandidas (5) Coléteres nos primórdios foliares (6) Par de NEF's baselaminares acropetiolares (9) NEF's marginais (10) NEF's na superfície da lâmina foliar (12) Tipo de laticíferos em *Croton* seção *Cleodora* e grupo externo. O estado ancestral para cada caráter foi estimado usando otimizações de verossimilhança nas 1000 árvores selecionadas após 'burn in' das análises de Inferência Bayesiana a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram.



(Figura 9)

Figura 8. Reconstrução do estado ancestral para os NEF's (7) Tamanho do pedúnculo e (8) Superfície secretora em Croton seção Cleodora e grupo externo. O estado ancestral para cada caráter foi estimado usando otimizações de verossimilhança nas 1000 árvores selecionadas após 'burn in' das análises de Inferência Bayesiana a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram. Figuras 8A e 8B, secções transversais de folhas incluídas em resina e coradas com azul de toluidina. **A.** *C. sphaerogynus* e **B.** *C. fragrans*. Barra: 400 μ m.

Figura 9. Reconstrução do estado ancestral para (13) Tipo de tricomas na face abaxial (14) Tipo de tricomas na face abaxial (15) Posição dos estômatos (16) Organização do mesofilo (17) Presença de esclereídes no mesofilo (18) Organização dos feixes vasculares em Croton seção Cleodora e grupo externo. O estado ancestral para cada caráter foi estimado usando otimizações de verossimilhança nas 1000 árvores selecionadas após 'burn in' das análises de Inferência Bayesiana a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE T. **Automat. Contr.** **19**: 716–723.
- Alves, M.V.; Estelita, M.E.M.; Wanderley, M.G.L. & Thomas, W.W. 2002. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 1-9.
- APG – The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society** **141**:399-436.
- Araújo, J.S.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C. & Meira, R.M.S.A. 2010. Leaf anatomy as an additional tool to taxonomy of 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). **Plant Systematic and Evolution** **286**:117-131.
- Baker, H. G., and I. Baker. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. **Israel Journal of Botany** **39** : 157 – 166.
- Bello, M.A., Bruneau, A., Forest, F., Hawkins, J.A., 2009. Elusive relationships within order Fabales: phylogenetic analyses using matK and rbcL sequence data. **Systematic Botany** **34**: 102–114.
- Bello, M.A., Rudall, P.J. & Hawkins, J.A. 2012. Combined phylogenetic analyses reveal interfamilial relationships and patterns of floral evolution in the eudicot order Fabales. **Cladistics** **1**: 1-29.
- Bentley, B. & Elias, T. 1983. **The biology of the nectaries**. Columbia University Press, New York.
- Berry, P.E.; Hipp, A.L.; Wurdack, K.J.; VanEe, B. & Riina, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** **92**: 1520-1534.
- Burger, W. & Huft, M. 1995. Flora costaricensis: Euphorbiaceae. **Fieldiana** **36**: 1-169.
- Campos, A.R.; Albuquerque, F.A.A.; Rao, V.S.N.; Maciel, M.A.M. & Pinto A.C. 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia** **73**: 116-120.
- Caruzo, M.B.R. 2010. **Sistemática de *Croton* sect. *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s.)**. Tese de Doutorado, Departamento de Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- Caruzo, M. B. R.; VanEe, B. W.; Cordeiro, I.; Berry, P. E. & Riina, R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in “Sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **60**: 193-206.

- Casacov, A., Sérsic, A.N., Sosa, V., De-Nova, J.A., Nylinder, S. & Cocucci, A.A. 2009. new insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phytogeographic patterns of *calceolaria* (calceolariaceae). **American Journal of Botany** **96**(12): 2240-2255.
- Chase, W.M.; Zmarzty, S., Lledó; M.D., Wurdack; K.J., Swensen; S.M. & Fay, M.F. 2002. When in doubt, put in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin** **57**: 141-181.
- Chin, Siew-wai , Lutz, S., Wen, J., & Potter, D. 2013. The bitter and the sweet: inference of homology and evolution of leaf glands in prunus (rosaceae) through anatomy, micromorphology, and ancestral-character state reconstruction. **International Journal of Plant Sciences** **174** (1): 27-46.
- Chippindale, P. T., and J. J. Wiens. 1994. Weighting, partitioning, and combining characters in phylogenetic analysis. **Systematic Biology** **43**:278–287.
- Coutinho, I.A.C.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany** **58**: 224-232.
- Delgado, M.N.; Azevedo, A.A.; Valente, G.E. & Kasuya, M.C.M. 2009. Morfo-anatomia comparada de espécies da subtribo *Coutoubeinae* (Chironieae-Gentianaceae). **Acta Botanica Brasilica** **23**: 956-967.
- De-Paula, O.C., Sajo, M.G., Prenner, G. Cordeiro, I & Rudall, P.J. 2010. Morphology , development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae-Malpighiales). **Plant systematic and Evolution** **292**: 1-14.
- Fahn, A. 1979. **Secretory Tissues in Plants**. Academic Press, London.
- Fisher , D. B. 1968 . Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology** **16**: 92 – 96.
- Freitas, L., Bernardello, G., Galetto, L. & Paoli, A.A.S. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **136**: 267–277.
- Goldberg, A. 1986. **Classification, Evolution and Phylogeny of the Families of Dicotyledons**. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Gomes, S.M.A., Silva, E.A.M., Lombardi, J.A., Azevedo, A.A. & Vale, F.H.A. 2005. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia da subfamília Hippocrateoideae (Celastraceae). **Acta Botanica Brasilica** **19**: 945-961.
- Gomes, A.P.S. 2006. **Revisão das espécies sul-americanas de *Croton* L. subgen. *Croton* sect. *Argyroglossum* Baill. (Crotonoideae-Euphorbiaceae)**. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil.
- Govaerts, R.; Frodin, D.G. & Radcliffe-Smith, A. 2000. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**.Vol. 2. Kew, Royal Botanic Gardens.

- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** **41**: 95–98.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** **17**: 754–755.
- Horn, J.W., Fisher, J.B., Tonlinson, P.B., Lewis, C.E. & Laubengayer, K. 2009. Evolution of lamina anatomy in the palm family (areaceae). **American Journal of Botany** **96**(8): 1462–1486.
- Horn, J.W., Van Ee, B.W., Morawetz, J.J., Riina, R. Steinmann, V.W., Berry, P.E. & Wurdak, K.J. 2012. Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **63**: 305-326.
- Johansen D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York.
- Jose, T. & Inamdar, J.A. 1989. Structure, ontogeny, and biology of nectaries in *Croton bonplandius* Baill. Beitr. **Biologie der Pflanzen** **64**:157-165.
- Judd, W.S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal**. Um Enfoque Filogenético. 3ª Ed. Artmed, Porto Alegre.
- Lersten, N. R. 1974. Morphology and distribution of Colleters and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **61**: 973-981.
- Lersten, N. R. & Horner, H. T. Jr. 1968. Development, structure and function of secretory trichomes in *Psychotria bacteriophila* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** **55**: 1089-1099.
- Lewis, P.O., 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. **Systematic Biology** **50**: 913–925.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** **8**: 21-75.
- Lopes, K.L.B.; Thadeo, M.; Azevedo, A.A.; Soares, A.A. & Meira, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany** **87**: 202-209.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Brabo, S.N. & Da Silva, M.N. 1998b. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry** **49**: 823-828.
- Maddison, W.P. 1996. Molecular approaches and the growth of phylogenetic biology. In: Molecular zoology: advances, strategies, and protocols, Ferraris, J.D. & Palumbi. Wiley.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2006. StocChar: a package of Mesquite modules for stochastic models of character evolution. Version 1.1.

- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. <<http://mesquiteproject.org>>.
- Mantovani, A., Venda, A.K.L., Almeida, V.R., da Costa A.F. & Forzza, R.C. 2012. **Plant Systematic Evolution** **298**: 787-800.
- Meira, R.M.S.A. & Martins, F.M. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore** **27**: 109-112.
- Mello-Silva, R., Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., Motta, L.B., Cattai, M.B., Sasaki, D., Lovo, J., Pita, P.B., Rocini, C., Rodrigues, C.D.N., Zarrei, M. & Chase, M.W. 2011. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany** **108**: 87–102.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Vol. I. Clarendon Press, Oxford.
- Morellato, L.P.C., & P.S. Oliveira. 1994. Extrafloral nectaries in the tropical tree *Guarea macrophylla* (Meliaceae). **Canadian Journal of Botany** **72** : 157 – 160 .
- Moreno, P.R.; Lima, M.E.L.; Caruzo, M.B.R.; Torres, D.S.C.; Cordeiro, I. & Yong, M.C.M. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) leaves. **Journal of Essential Oil Research** **21**: 190-192.
- Müller, J. 1873. *Croton*. Pp. 81-274 In: Martius, C.F.P. von. **Flora brasiliensis**. Vol 11(2). Munich. Vienna & Leipzig.
- Nishida, S. & Werff, H. 2011. An evaluation of classification by cuticular characters of the lauraceae: a comparison to molecular phylogeny. **Annals of Missouri Botanical Gardens** **98**: 348–357.
- O'Brien, T.P. & McCully, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- Paiva, E. A. S. & Machado, S. R. 2006. Colleters in *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae), ontogenesis, ultrastructure and secretion. **Brazilian Journal of Biology** **66**: 301-308.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253 – 1256 .
- Riina, R. 2006. **Molecular Systematics of the Neotropical Dragon's Blood trees *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae)**. Doctoral dissertation. University Of Wisconsin, Madison. Pp. 106.
- Riina, R.; Berry, P.E. & VanEe, B.W. 2009. Molecular phylogenetics of the Dragon's Blood *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany** **34(2)**: 360-374.

- Riina, R.; VanEe, B.W.; Wiedenhoef, A.C.; Cardozo, A. & Berry, P.E. 2010. Sectional rearrangement of arborescent clades of *Croton* (Euphorbiaceae) in South America: Evolution of arillate seeds and a new species, *Croton domatifer*. **Taxon** **59**: 1147-1160.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572--1574.
- Roshchina, V.V., and V.D. Roshchina. 1993. **The excretory function of higher plants**. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Sá-Haiad, B.; Serpa-Ribeiro, A.C.C.; Barbosa, N.C.; Pizzini, D.; Leal, D. de O.; Senna Vale, L. & Santiago-Fernandes, L.D.R. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Systematic and Evolution** **283**: 179-202.
- Salatino, A.; Salatino, M.L.F. & Negri, G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society** **18**: 11-33.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **American Journal of Botany** **29**: 464-471.
- Sartori, A.L.B. e Tozzi, A.M.G.A. 2002. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-Papilionoideae-Sophoreae) species. **Botanical Journal of the Linnean Society** **140**: 249-259.
- Scatena, V.L.; Cardoso, V.A. e Giulietti, A.M. 1999. Morfoanatomia de espécies de *Blastoculon* Ruhland (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasileira** **13**: 29-41.
- Seigler, D.S. 1998. **Plant Secondary Metabolism**. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts, USA.
- Solereder H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Swofford, D. L. 2002. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thadeo, M.; Cassino, M.F.; Vitarelli, N.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of foliar glands of *Prockia crucis* p. Browne ex. L. (Flacourtiaceae). **American Journal of Botany** **95**: 1515-1522.
- Tokuoka, T. & Tobe, H. 1998. Ovules and seeds in Crotonoideae (Euphorbiaceae): structure and systematic implications. **Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie** **120**: 165–186.
- Thomas, V. 1991. Structural, Functional and Phylogenetic Aspects of the Colleter. **Annals of botany** **68**: 287-305.

- Van Ee, B.W., Jelinski, N., Berry, P.E., & Hipp§, A.L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. **Molecular Ecology** **15**: 2735–2751.
- Van Ee, B.W., Berry, P.E., Riina, R. & Gutiérrez Amaro, J.E. 2008. Molecular phylogenetics and biogeography of the Caribbean-centered *Croton* subgenus *Moacroton* (Euphorbiaceae s.s.). **Botanical Review Lancaster** **74**: 132–165.
- VanEe, B.W. & Berry, P.E. 2009. The circumscription of *Croton* sect. *Crotonopsis* (Euphorbiaceae), a north american endemic. **Harvard Papers in Botany** **14**: 61-70.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2010. Taxonomy and phylogeny of *Croton* section *Heptallon* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany** **35**: 151–167.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2011. *Croton* Section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a Novel New World Group, and a New Subsectional Classification of *Croton* Section *Lamprocroton*. **Systematic Botany** **36(1)**: 88–98.
- VanEe, B.W.; Riina, R. & Berry, P.E. 2011. A revised infragenérico classification and molecular phylogeny of new world *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **60**: 1-33.
- Vega, A.S., Castro, M.A. & Anderson, W.R. 2002. occurrence and phylogenetic significance of latex in the malpighiaceae. **American Journal of Botany** **89(11)**: 1725-1729.
- Webster, G.L. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **42**: 793-823.
- Webster, G.L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals Missouri Botanical Garden** **81**: 33-144.
- Webster, G. L.; Del-Arco Aguilar, M.J. & Smith, B.A. 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **121**: 41-57.
- Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Townsend, T., Reeder, T.W., Mulcahy, D.G., Sites, J.W., 2010. Combining phylogenomics and fossils in higher-level squamate reptile phylogeny: molecular data change the placement of fossil taxa. **Systematics Biology** **59**: 674–688.
- Wurdack, K.J. & Davis, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany** **96**: 1551-1570.
- Zhou, W. & Xia, Nian-He. 2012. Leaf epidermal features of *Lithocarpus* (Fagaceae) from China and their systematic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **168**, 216–228.

APÊNDICE I: Taxa, voucher, herbário consultado e número de acesso no GenBank (ITS, trnL-F, psbA-trnH). Missing data: -

Astrea lobata (L.) Klotzsch Melo 1285 (SP); EU586945.1, HM044768.1, HM044809.1/
Brailiocroton mamoninha Berry & Cordeiro Fiaschi 951 (SPF); EU586944.1,
EU586998.1, HM044810.1/ *C. billbergianus* Müll. Arg. Wiley 7 (RB); EU477998.1,
EU478148.1, HM044813.1/ *C. cajucara* Benth. Caruzo 95 (SP); Jangoux 1051 (RB);
HM044789.1, HM044770.1, HM044814.1/ *C. campanulatus* Caruzo & Cordeiro Lima
469 (SP); Monteiro 7964-I (RBR); HM044790.1, HM044771.1, HM044815.1/ *C.*
cuneatus Klotzsch Lima 1510 INPA; EU497735.1, AY794698.1, HM044816.1/ *C.*
fragrans Kunth. Caruzo et al. 125 (SP); HM044791.1, HM044772.1, HM044820.1/ *C.*
fragrantulus HM044792.1, HM044773.1, HM044821.1/ *C. gnaphalii* Baill. Marchett
545 (BHCB); EU586940.1, EU586994.1, HM044846.1/ *C. hemiargyreus* Müll. Arg.
Caruzo 114 (SP), Nascimento 473 (RB); HM044793.1, HM044774.1, HM044824.1/ *C.*
heterocalyx Baill. Caruzo 108 (SP); HM044794.1, HM044775.1, HM044825.1/ *C.*
hoffmannii EF421773.1, EF408111.1, HM044826.1/ *C. organensis* Baill. Caruzo 90
(SP), Prado 366 (RB); EU586914.1, EU586969.1, HM044832.1/ *C. orinocensis* Müll.
Arg. Caruzo 124 (SP); HM044799.1, HM044779.1, HM044834.1/ *C. palanostigma*
Klotzsch Cordeiro 192 (SP); EU586943.1, EU586997.1, HM044835.1/ *C. pallidulus*
Baill. Lima 319 (SP); EU586939.1, EU586993.1, - / *C. pseudofragrans* HM044800.1,
HM044780.1, HM044837.1/ *C. rottlerifolius* Baill. Lima 139 (SPF); HM044801.1,
HM044781.1, HM044838.1/ *C. sacaquinha* Croizat Rodrigues s/n° (HB); HM044802.1,
HM044782.1, HM044839.1/ *C. salutaris* Casar. Caruzo 89 (SP), Pardo 108 (RBR);
HM044804.1, HM044783.1, HM044840.1/ *C. sphaerogynus* Baill. Caruzo 88 (SP),
Landrum 2052 (RB); HM044805.1, HM044784.1, HM044843.1/ *C. spruceanus* Benth.
Ducke s/n° (RB); HM044806.1, HM044785.1, HM044844.1/ *C. yavitensis*
EU586918.1, EU586973.1, HM044847.1.

* Dados complementares para as espécies do grupo externo foram obtidos a partir do trabalho de Soares (2012).

APÊNDICE II: Caracteres e estados de caráter utilizados na construção da matriz de dados anatômicos

Carácter	Estado de carácter
1. Posição dos idioblastos secretores	(0) Ocorrem voltados tanto para a face abaxial quanto para a face adaxial da folha; (1) Ocorrem voltados somente para a face adaxial (ADA) das folhas; (2) Ocorrem voltados somente para a face abaxial (ABA) das folhas.
2. Estado transitório entre idioblastos secretores e tricomas secretores	(0) Ausente; (1) Presente.
3. Tricomas secretores na face abaxial (ABA) das folhas	(0) Ausente; (1) Presente.
4. Coléteres em folhas completamente expandidas	(0) Ausente; (1) Presente.
5. Coléteres nos primórdios foliares	(0) Ausente; (1) Presente.
6. Par de NEF's baselaminares/acropeciolaes	(0) Ausente; (1) Presente; (2) Ocorrência de mais de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes.
7. Comprimento do pedúnculo do NEF baselaminar/acropeciolar	(0) Séssil; (1) Curto, que apresenta largura menor do que três vezes a largura da cabeça secretora do NEF; (2). Longo, que apresenta largura igual ou maior do que três vezes a largura da cabeça secretora do NEF.
8. Forma da superfície secretora do NEF	(0) Côncava; (1) Convexa; (2) Reta ou convexa com as margens elevadas
9. NEF's ao longo da margem das folhas	(0) Ausente; (1) Presente.
10. NEF's na superfície da lâmina foliar	(0) Ausente; (1) Presente.
11. Laticíferos	(0) Ausente; (1) Presente.
12. Tipo de laticífero	(0) Articulado não ramificado; (1) Articulado ramificado.
13. Tipo de tricomas na face abaxial (ABA) das folhas	(0) Lepidoto; (1) Multirradiado; (2) Estrelado; (3) Simples; (4) Estrelados e simples presentes sem que exista a predominância de um sobre outro.
14. Tipo de tricomas face adaxial (ADA) das folhas	(0) Lepidoto; (1) Multirradiado; (2) Estrelado; (3) Simples ou simples com raios laterais suprimidos; (4) Estrelados e simples presentes sem que exista a predominância de um sobre outro.
15. Classificação da folha com relação à posição dos estômatos	(0) Hipoestomática; (1) Anfiestomática.
16. Organização do mesofilo	(0) Dorsiventral; (1) Isobilateral.
17. Esclereídes no mesofilo	(0) Ausente; (1) Presente.
18. Organização do Feixe Vascular na região apical do pecíolo	(0) Colateral; (1) Bicolateral.
19. Nectários nos primórdios foliares	(0) Ausente; (1) Presente.

Capítulo III:
**“Caracteres anatômicos foliares de *Croton* seção
Lamprocroton (Euphorbiaceae): filogenia e reconstruções dos
estados ancestrais”**

**Caracteres anatômicos foliares de *Croton* seção *Lamprocroton* (Euphorbiaceae):
filogenia e reconstruções dos estados ancestrais**

Resumo: As relações filogenéticas entre as espécies da seção *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* foram estudadas à luz da filogenia molecular e história evolutiva dos caracteres anatômicos foliares. Foram feitas análises de Máxima parcimônia a partir de matrizes de dados moleculares, considerando regiões do genoma nuclear (ITS) e plastidial (*TrnL-TrnF*), e de dados anatômicos, a partir de caracteres diagnósticos da estrutura foliar. Foram realizadas reconstruções dos estados ancestrais dos principais caracteres diagnósticos, utilizando o critério de parcimônia. A presença de tricomas secretores na face abaxial das folhas é uma sinapomorfia da seção *Lamprocroton*, observada também em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*). Estas estruturas são homólogas aos idioblastos secretores, que se restringem, portanto, à face adaxial das folhas na seção *Lamprocroton*. Acredita-se que esta seção evoluiu a partir de linhagens de *Croton* que não possuíam nectários extraflorais (NEF'S), estrutura não observada neste clado. Coléteres marginais, laticíferos articulados não ramificados e mesofilo dorsiventral são característicos de *Lamprocroton*. Na filogenia *C. imbricatus* emerge fora da seção *Lamprocroton*. A presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciolares, idioblastos secretores conspícuos voltados para ambas as faces foliares, mesofilo isobilateral e ausência de tricomas secretores nesta espécie corroboram seu posicionamento fora de *Lamprocroton*. Um novo rearranjo subseccional é sugerido, com a remoção de *C. pygmaeus* da subseção *Lamprocroton* para a subseção *Argentini*, a qual passa a englobar espécies com estiletes não ramificados, bífidos ou multifídios, com 6, 12 ou mais superfícies estigmáticas.

Palavras chave: *Croton*, caracteres anatômicos, relações filogenéticas, evidência total, estruturas secretoras.

INTRODUÇÃO

Croton L. é o segundo maior gênero de Euphorbiaceae com mais de 1200 espécies, apresenta uma grande diversidade morfológica e ampla distribuição geográfica. Estes fatores aliados à falta de distintas sinapomorfias morfológicas para as suas seções fazem com que a taxonomia e a sistemática deste gênero sejam complexas (Riina 2006; Van Ee *et al* 2011). A presença de estames encurvados no botão floral é a única sinapomorfia sugerida para o gênero (Berry *et al* 2005; Lima & Pirani 2008). *Croton* é caracterizado pelas inflorescências terminais do tipo tirso e por pétalas geralmente reduzidas nas flores pistiladas (Caruzo & Cordeiro 2007). A presença de látex não-leitoso e o tipo de indumento são características utilizadas para distinguir com facilidade *Croton* dos demais gêneros de Crotonoideae (Webster 1967).

A primeira delimitação formal da seção *Lamprocroton* foi feita por Müller (1873) na *Flora brasiliensis* como sendo uma série da seção *Decarinium*, e a presença de tricomas lepidotos foi a característica utilizada para distinguir as espécies de *Lamprocroton* daquelas de *Geiseleria* (série que, junto com *Lamprocroton*, constituía a seção *Decarinium*). O número de divisões do estilete e a presença de tricomas lepidotos são características utilizadas na delimitação das espécies circunscritas em *Lamprocroton* desde que esta foi elevada à categoria de seção (Pax 1980; Pax & Hoffman 1931; Webster 1993; Lima & Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011).

A seção *Lamprocroton* foi caracterizada por incluir espécies tanto com estiletos bífidos como com estiletos duas vezes bífidos (Müller 1873). Entretanto, Webster (1993) recircunscreveu esta seção incluindo apenas espécies com estiletos bífidos. Posteriormente, Lima & Pirani (2008), numa revisão taxonômica da seção com base em caracteres morfológicos, retornaram à circunscrição de Müller (1873). A delimitação proposta nesta revisão (Lima & Pirani 2008) é suportada pelo único trabalho de filogenia molecular realizado com espécies da seção *Lamprocroton* (VanEe *et al.* 2011), no qual as espécies com estiletos bífidos aparecem como grupo irmão daquelas que apresentam estiletos multifídeos, reconhecendo cada um desses clados como uma subseção em *Lamprocroton*. Desta forma, a mais recente delimitação desta seção estabelece a subseção *Lamprocroton* (Müll. Arg.) B.W. VanEe & P.E. Berry, caracterizada pela presença de estiletos bífidos e tricomas primordialmente lepidotos e a subseção *Argentini* B.W. VanEe & P.E. Berry, caracterizada pela presença de estiletos duas ou mais vezes bífidos e tricomas primordialmente estrelados. Entretanto, na

filogenia molecular (VanEe & Berry 2011) apenas 5 das 26 espécies circunscritas na seção *Lamprocroton sensu* Lima & Pirani (2008) foram avaliadas, tendo sido adicionadas outras duas espécies consideradas de posicionamento duvidoso por Lima & Pirani (2008). Desta forma, as reais interpretações quanto às afinidades entre as espécies da seção *Lamprocroton* são ainda desconhecidas e justificam a necessidade de ampliar o número de espécies avaliadas em estudos com abordagens não apenas filogenética, mas que considerem ainda a morfologia e anatomia do grupo.

A Anatomia Vegetal contribui com a resolução de problemas taxonômicos (Metcalf & Chalk 1950, 1979, 1983) desde o século XIX, quando os caracteres anatômicos foram utilizados para a identificação ou delimitação de espécies, gêneros ou famílias botânicas (Solereder 1908) e têm sido utilizados com sucesso como subsídio para análises taxonômicas e filogenéticas (Goldberg 1986; Tokuoka & Tobe 1998; Scatena *et al.* 1999; Alves *et al.* 2002; Sartori & Tozzi 2002; Gomes *et al.* 2005; Rio *et al.* 2005; Thadeo *et al.* 2008; Delgado *et al.* 2009; Lopes *et al.* 2009; Sá-Haiad *et al.* 2009; Horn *et al.* 2009; Wiedenhoeft *et al.* 2009; Araújo *et al.* 2010; De-Paula 2010; Coutinho *et al.* 2010; Riina *et al.* 2010; Mello-Silva *et al.* 2011; Nishida & Werff 2011; Mantovani *et al.* 2012; Pecnikar *et al.* 2012; Zhou & Xia 2012; Chin *et al.* 2013). Muitos desses trabalhos enfocam espécies tropicais, com grande representatividade na flora brasileira.

O Brasil é um dos principais centros de diversidade de *Croton* (Burger & Huft 1995), sendo a seção *Lamprocroton* estritamente Sul americana e amplamente distribuída no leste do Brasil, especialmente na Mata Atlântica, no Cerrado, na Caatinga e na Restinga (Lima & Pirani 2008). As espécies de *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011) são bem representadas nos complexos rupestres de altitude brasileiros, sendo comuns em altitudes superiores a 1.000 m (Lima & Pirani 2008).

O objetivo da presente proposta foi realizar um estudo filogenético das espécies de *Croton* seção *Lamprocroton* subseção *Lamprocroton sensu* Van Ee & Berry (2011) e grupo externo, considerando dados moleculares (ITS e *TrnL-TrnF*) e anatômicos visando elucidar a interrelação entre as espécies através da reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres anatomicos e de análises filogenéticas usando caracteres moleculares e matrizes combinadas de caracteres anatômicos e moleculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas no presente trabalho 23 espécies, sendo 21 do gênero *Croton* e ainda *Brasiliocroton mamoninha* e *Astraea lobata* (Tabela 1). Dezesete espécies estão circunscritas na subseção *Lamprocroton* da seção *Lamprocroton sensu* Van Ee & Berry (2011), das quais 11 foram analisadas na presente proposta. O critério de escolha das espécies foi o seu padrão de distribuição geográfica. Todas as espécies da subseção *Lamprocroton* amostradas ocorrem nos complexos rupestres do Brasil na cota acima dos 1000 m de altitude, provenientes dos campos rupestres e campos de altitudes brasileiros.

Tabela 1. Taxa e voucher estudados.

	Espécie	Coletor, sigla herbário consultado
Lamprocroton	1. <i>Croton ceanothifolius</i> Baill.	Lima 325* (SP 370498)
	2. <i>Croton dichrous</i> Müll. Arg.	Alvim 46 (HUEMG 0667)/ Vitarelli 012 (VIC ###)/ Cordeiro 2771 (SP 356401) / Stehmann 2504 (SP 370574)
	3. <i>Croton erythroxyloides</i> Baill.	Vitarelli 002 (VIC 33005) / Vitarelli 005 (VIC 33008) / Vitarelli s/nº* (VIC 33012)
	4. <i>Croton imbricatus</i> L.R. Lima & Pirani	Laessor s/nº* (SP 311439)/ Furlan s/nº (SPF 18774)
	5. <i>Croton muellerianus</i> L.R. Lima	Ribas 926* (BHCB 31110)
	6. <i>Croton myrianthus</i> Müll. Arg.	Lima 296* (SP 3770497)
	7. <i>Croton pallidulus</i> Baill.	Lima 319 (SP 370557)
	8. <i>Croton pseudoadipatus</i> Croizat	Monteiro <i>et al</i> 009* (HUEMG 1749) /Monteiro <i>et al</i> 017* (HUEMG 1750)
	9. <i>Croton pygmaeus</i> L. R. Lima	Falkenberg 6483 (BHCB 29075)/ Marchett 549* (BHCB 107725)
	10. <i>Croton splendidus</i> Mart.	Alvim s/nº (HUEMG 1726)/ Alvim 40 (HUEMG 1748) /Vitarelli s/nº* (VIC 33004)/ Vitarelli s/nº* (VIC 33004)
	11. <i>Croton</i> sp. L458	Lima 458* (SP 399329)
	12. <i>Croton</i> sp. L519	Lima 519* (SP 409038)
	13. <i>C. gnaphalli</i> Baill.	Marchett 545 (BHCB ###)
Grupo Externo	14. <i>Croton alabamensis</i> E. A. Smith ex Chapman	Keener 2472 (SP 366447) / Berry s/nº (VIC ###)
	15. <i>C. burchellii</i> Müll. Arg.	Anderson 6827 (MO)
	16. <i>C. cuneatus</i> Klotzsch	Lima 1510 (INPA ###)
	17. <i>C. fragrans</i> Kunth	Caruzo <i>et al.</i> 125 (SP)
	18. <i>C. hemiargyreus</i> Müll.Arg	Caruzo 114 (SP) / Nascimento 473 (RB)
	19. <i>C. heterocalyx</i> Baill	Caruzo 108 (SP)
	20. <i>C. orinocensis</i> Müll.Arg.	Caruzo 124 (SP)
	21. <i>C. sacaquinha</i> Croizat	Rodrigues s/nº (HB 47013)
	22. <i>Astraea lobata</i> (L.) Klotzsch	Melo 1285 (SP)
	23. <i>Brasiliocroton mamoninha</i> Berry & Cordeiro	Fiaschi 951 (SPF)

* Vouchers utilizados no seqüenciamento do DNA

Anatomia

Amostras das folhas são provenientes de material herborizado (Tabela 1), sendo analisadas folhas em diferentes estádios de desenvolvimento (primórdios foliares, folhas jovens e completamente expandidas), seguindo a mesma padronização adotada por Vitarelli (2013, Cap. II).

Após a reversão da herborização (Smith & Smith 1942), as amostras foram desidratadas em série etílica e estocadas em etanol 70%. Para obtenção de cortes o material foi incluído em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments) seguindo o procedimento de Meira & Martins (2003). Foram obtidos cortes transversais e longitudinais (5 µm de espessura), em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc.) com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981) e as lâminas montadas com água glicerizada ou com resina sintética tipo Permount (Fischer 1968).

Peças inteiras foram diafanizadas, coradas com safranina (1% solução alcoólica) e as lâminas montadas com gelatina glicerizada (Johansen 1940, modificado).

Todas as observações e a documentação fotográfica foram realizadas em um microscópio de luz (modelo AX70TRF, Olympus Optical) equipado com sistema de captura de imagens. Para a observação sob luz fluorescente, foi utilizado o filtro UV.

Foram selecionados 20 caracteres anatômicos para a elaboração de uma matriz de dados considerando os diferentes estados de cada caráter (Apêndice II). Os dados relativos às estruturas secretoras foram obtidos a partir do trabalho de Vitarelli (2013, Cap. II).

Sequenciamento do DNA

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Sistemática Molecular (CSIC-RJB, Madrid). Foram trituradas 15 a 20 mg de tecido foliar utilizando o equipamento TissueLyser II (QIAGEN Germany), a partir de amostras de folhas de cada uma das espécies de interesse (Tabela 1). A extração do DNA de cada uma das amostras foi feita utilizando-se Dneasy® Plant Mini kit (QIAGEN, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As regiões genéticas amplificadas foram as mesmas feitas por Van Ee & Berry (2011): a nuclear ribossomal ITS (ITS1, 5.8s, e ITS2) e a cloroplastidial *trnL* intron e o espaçador intergênico *trnL-F*, estes dois loci têm sido utilizados em todos os trabalhos de filogenia com espécies de *Croton* (Berry *et al.* 2005;

Van Ee *et al.* 2008; Cordeiro *et al.* 2008; Van Ee & Berry 2009, 2010, 2011; Riina *et al.* 2009, 2010; Caruzo *et al.* 2011). Para amplificar e sequenciar a região do ITS utilizou-se o primer universal ITS1 e ITS4 (Urbatsch *et al.* 2000; White *et al.* 1990); a região *trnL-F* foi amplificada e sequenciada através dos primers “e” & “f” e a região *trnL* dos primers “c” & “d” (Taberlet *et al.* 1991).

O método de amplificação de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi feito com puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden) após adição de 1 µl of DMSO (4% v/v), 0.5 µl de cada primer (10 µM), 1 µl de DNA (45–130 µg mL⁻¹) em GeneAmp 9700 PCR system (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA). A amplificação da região de ITS em PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min e com processo cíclico de amplificação de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 1 min; 72 °C por 10min, com 35 ciclos de repetição. A região de *trnL-F* em PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min e com processo cíclico de amplificação de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min e 30 seg, 72 °C por 2 min; 72 °C por 10 min, com 35 ciclos de repetição.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) conforme protocolo de instrução do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados em ambas as direções no sequenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, CA) (STAB-Vida, Oeiras, Portugal).

As sequências foram editadas e montadas utilizando-se o software Staden (v.2.0 Staden, 1996). As sequências recém geradas juntamente com as sequências obtidas no Genbank (Appendix I) foram automaticamente alinhadas no Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Os programas BioEdit v. 7.0.0 (Hall, 1999) e MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007) para fazer os ajustes manuais do alinhamento usando o critério de similaridade. Os dois conjuntos de dados (ITS e *trnL-F*) foram combinados em uma única matriz que foi analisada para gerar uma hipótese filogenética com abordagens em Máxima Parcimônia (MP) e de Inferência Bayesiana (IB), como descrito abaixo.

Amostragem taxonômica

Foram construídas três matrizes de dados: **Matriz A** que inclui as 23 espécies da Tabela 1 com os dados moleculares de ITS (688 caracteres) e de *trnL-F* (1108 caracteres). A **Matriz B** que inclui a mesma amostragem taxonômica e molecular da matriz A, sendo adicionados 20 caracteres anatômicos (Apêndice II). A **Matriz C** que inclui somente dados moleculares (ITS and *trnL-F*) das mesmas 23 espécies analisadas

nas matrizes A, e B mais 22 espécies de *Croton* adicionais externas à seção *Lamprocroton* (cujos dados moleculares foram obtidos do GenBank - Apêndice I). Esta amostragem expandida construída com a matriz C foi feita com o objetivo de fornecer uma visão mais ampla das possíveis relações filogenéticas entre *C. imbricatus* e demais espécies de *Croton* externas à seção *Lamprocroton*, uma vez que esta espécie emergiu fora de *Lamprocroton* nas análises iniciais feitas a partir das matrizes A e B.

Análises Filogenéticas

Análises heurísticas em MP foram desenvolvidas em PAUP* 4.0b (Swofford 2002) com 1000 replicagens aleatóres dos taxa usando TBR branch-swapping. Todos os caracteres foram incluídos nas análises. Os caracteres foram tratados como de igual peso e os intervalos como missing data. Os valores de MP bootstrap (BS) para as matrizes combinadas do genoma nuclear e plastidial foram estimadas com 1000 replicagens de bootstrap com 100 replicagens adicionais aleatóreas (RASR), tree bisection reconnection (TBR) e nchuck = 100.

As analyses Bayesianas foram conduzidas em MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As probabilidades Bayesianas (posterior probabilities -PP) foram calculadas a partir do método estatístico de cadeia Markov de Monte Carlo (MCMC), consistindo de 4 cadeias ligadas (nchains = 4; nruns = 2; heat = 0.02), 10000000 gerações, com amostragem a cada 100 gerações. Todos os caracteres foram incluídos nas analyses e os dados foram divididos em três partes (duas genéticas: ITS, *trnL-F*, e, para algumas análises foi incluída a parte de dados anatômicos). O programa JModelTest v. 0.1.1 (Posada, 2008), através do critério Akaike Information Criterion (AIC; Akaike 1974), foi utilizado para estimar os melhores modelos para cada uma das partes genéticas, sendo selecionado para ITS o modelo: GTR + G e para *trnL-F* o modelo: TPM3uf+G). O modelo MK foi o utilizado para a parte de dados anatômicos (Lewis 2001). O período padrão de burn-in foi utilizado (burninfrac=0,25). Após a remoção das árvores indicadas neste período, os valores de PP foram obtidos pela regra de maior consenso a partir das análises de MCMC.

As árvores filogenéticas resultantes foram visualizadas no programa FigTree v. 1.4.1 e editadas no programa Coreldraw X5.

Reconstrução do Estado de Caráter Ancestral

Foi elaborada uma matriz de dados com 20 caracteres anatômicos diagnósticos obtidos através do estudo de anatomia foliar realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV (Viçosa, Brasil) para proceder o mapeamento destes dados sobre as

árvores resultantes utilizando o programa Mesquite v. 2.75 (Maddison and Maddison 2006, 2010).

A análise para a Reconstrução do Estado de Caráter Ancestral foi feita em Mesquite v. 2.75, mediante a construção de um bloco com as melhores árvores geradas pelas análises de MP. Os caracteres anatômicos foram reconstruídos sobre essas árvores utilizando-se o comando “trace characters over trees”, sendo reconstruído o estado ancestral mais parcimonioso para cada caráter sobre as árvores estocadas no bloco. As reconstruções foram salvas em formato “pdf” e editadas em Coreldraw X5.

RESULTADOS

Análises Filogenéticas: molecular e combinadas (Evidência Total)

As análises de Máxima Parcimônia (MP) da matriz A produziram 694 árvores mais parcimoniosas com 707 passos cada, com índice de consistência (CI) = 0.75 e índice de retenção (RI) = 0.76 (Fig. 1). Por outro lado, as análises de MP da matriz B produziram 644 árvores mais parcimoniosas com 789 passos cada, com índice de consistência (CI) = 0.71 e índice de retenção (RI) = 0.72 (Fig. 2). Finalmente, as análises em MP da matriz C produziram 350058 árvores mais parcimoniosas cada uma com 1177 passos, com índice de consistência (CI) = 0.62 e índice de retenção (RI) = 0.76 (Fig. 3).

A árvore consenso gerada pelas análises de Máxima Parcimônia (MP) da matriz A foi escolhida para ilustrar a relação entre as espécies circunscritas na seção *Lamprocroton* (Fig. 1). Em contrapartida, uma das 644 melhores árvores geradas pelas análises de MP da matriz B ilustra a relação entre as espécies de *Lamprocroton* quando os caracteres anatômicos são adicionados aos moleculares (Fig. 2). A árvore escolhida de entre as 644 melhores árvores foi aquela com a topologia que se mostrou mais condizente com as afinidades anatomicas entre as especies ou grupos. As árvores resultantes das análises Bayesianas não foram ilustradas, uma vez que mostram uma topologia semelhante àquelas geradas em MP, não trazendo informações adicionais. A árvore consenso resultante de MP foi escolhida em detrimento à de IB por apresentar uma topologia mais simples e que ilustra melhor as relações entre as espécies de *Lamprocroton*. Ainda assim, os valores de posterior probabilidade (PP) foram plotados nas árvores consenso de MP juntamente com os valores de bootstrap (Figs. 1 e 2).

As análises filogenéticas em MP mostram a seção *Lamprocroton* como um grupo monofilético e com alto suporte para a sua subdivisão em dois clados bem

definidos (Figuras 1 e 2). O clado 1, o qual compreende *C. gnaphalii* e *C. pygmaeus* (100%BS, 1PP matriz A e 99%BS, 1PP matriz B) e o clado 2, que compreende *C. ceanothifolius*, *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. muellerianus*, *C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*, *C. splendidus* e duas espécies não identificadas (*Croton* sp. L519 e *Croton* sp. L 458). Este segundo clado é ilustrado por uma grande politomia na topologia da árvore resultante da matriz A (Fig. 1, 78%BS, 0,9PP) ou por grupos com baixa resolução para as relações entre as espécies, como ilustrado na árvore resultante da matriz B (Fig. 2, 52%BS, 0,9PP). Ainda assim, verifica-se uma tendência para o agrupamento de *C. muellerianus* juntamente com *Croton* sp. L519 e *Croton* sp. L 458 em um clado separado das demais espécies da subseção *Lamprocroton* (66%BS matriz A e 56%BS matriz B).

A topologia das árvores resultantes das análises de MP das matrizes A (árvore consenso) e B (melhor árvore) mostram que *Croton imbricatus* emerge fora de *Lamprocroton*, evidenciando que esta espécie está erroneamente inserida nesta seção. A matriz C (Fig. 3) engloba um maior número de espécies e a árvore consenso gerada pelas análises de MP desta matriz ilustra os possíveis clados mais proximamente relacionados à *C. imbricatus* (Fig. 3).

A árvore consenso resultante das análises em MP de uma matriz molecular que inclui informações do genôma nuclear (ITS) apenas (dados não mostrados) mostra *Croton imbricatus* e *C. polyandrus* como espécies irmãs constituindo um mesmo clado. Até o momento, *C. polyandrus* representa uma seção monoespecífica de *Croton*, entretanto os resultados do presente trabalho indicam uma relação próxima com *C. imbricatus*, podendo estas duas espécies constituir uma única seção. Por outro lado, na árvore resultante da matriz C (Fig. 3), *C. polyandrus* emerge como irmã das espécies da seção *Geiseleria*. A topologia desta árvore mostra ainda, uma proximidade de *C. imbricatus* com *C. megalodendron* e *C. palanostigma* (seção *Luntia*).

Reconstrução do Estado Ancestral dos caracteres anatômicos

As figuras (4 e 5) ilustram a reconstrução do estado ancestral dos caracteres anatômicos sobre as 644 melhores árvores resultante da análise de Máxima Parcimônia (MP) da matriz B.

A seção *Lamprocroton* é monofilética, porém as relações entre *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. splendidus*, *C. pallidulus*, *C. dichrous*, *C. pseudoadipatus* e *C. ceanothifolius* (subseção *Lamprocroton*) não estão esclarecidas. A

topologia representada reflete uma interrelação hipotética fracamente suportada, como observado pelo alto índice de ausência dos nós representados nos ramos terminais em que cada uma dessas espécies emerge (porcentagem ilustrada pela coloração vermelha). O nó do clado (*C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*) está presente em 278 das 644 árvores. O nó do clado (*C. dichrous* (*C. splendidus* (*C. ceanthifolius* (*C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*)))) aparece em 99 das 644 árvores, enquanto o nó do clado (*C. splendidus* (*C. ceanthifolius* (*C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*))) em apenas 75 das 644 árvores. O nó do clado (*C. ceanthifolius* (*C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*)) ocorre em 102 das 644 árvores e, finalmente, o nó do clado (*C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*) está presente em 278 das 644 árvores analisadas.

Devido à ausência de dados para *C. yavitensis* os estados de caráter desta espécie foram marcados na matriz como ‘missing data’ para todos os caracteres. Devido a proximidade entre as espécies, para efeito de interpretação dos caracteres reconstruídos, foi considerado para *C. yavitensis* os mesmos estados plotados para *C. cuneatus* em cada caráter avaliado.

Os resultados obtidos a partir da otimização de cada um dos caracteres analisados são descritos abaixo.

Idioblastos secretores (caráteres 1 e 2, Fig. 4): A presença de idioblastos secretores em *Croton* é comum, sendo variável a posição que ocupam no mesófilo dentre as diferentes linhagens do gênero. Em *Astraea lobata* os idioblastos secretores ocorrem voltados apenas para a face adaxial, enquanto que em *Brasiliocroton mamoninha* eles ocorrem voltados apenas para a face abaxial, consequentemente as reconstruções foram equívocas no nó da raiz da árvore, não sendo possível definir um melhor estado para o ancestral comum entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*. As reconstruções mostram que o estado de caráter mais parcimonioso para o ancestral de *Croton* é a presença de idioblastos secretores voltados para a face abaxial das folhas (estado reconstruído no nó deste gênero nas 644 árvores amostradas). Este estado é mantido nas seções *Cleodora* e *Cuneati* e em *C. burchellii* (seção *Pedicellati*). Por outro lado, para a seção *Lamprocroton*, idioblastos secretores voltados para a face adaxial foi o estado reconstruído para nó de seu ancestral em todas as 644 árvores analisadas, e se mantém predominantemente na subseção *Lamprocroton*. Em *C. gnaphalii* (subseção *Argentini*), assim como ocorre em espécies de *Cleodora*, os idioblastos secretores voltados para a face adaxial mostram-se como estruturas transitórias entre idioblastos e tricomas secretores. Em algumas espécies de *Lamprocroton* observa-se a ausência

completa dos idioblastos, como é o caso de *Croton* sp. L519, *Croton* sp. L458 e *C. splendidus* (subseção *Lamprocroton*) e de *C. pygmaeus* (subseção *Argentini*). Idioblastos secretores não ocorrem também nas folhas de *C. alabamensis*. Em *C. imbricatus*, que emerge fora de *Lamprocroton*, os idioblastos secretores ocorrem voltados para ambas as faces foliares. Dentre as demais espécies do grupo externo, apenas *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*) mostra o mesmo padrão predominante em *Lamprocroton*, com idioblastos secretores voltados apenas para a face adaxial.

Tricomas secretores (caráter 3, Fig. 4): Ausência de tricomas secretores é o estado reconstruído no nó da raiz das 644 árvores analisadas e embora este seja o estado reconstruído no nó do ancestral comum de *Croton* (nas 644 árvores analisadas), a presença destas estruturas na face abaxial das folhas é um caráter diagnóstico para *Lamprocroton*, estando presente em todas as suas espécies estudadas, tanto da subseção *Lamprocroton* quanto da subseção *Argentini* (estado reconstruído no nó de *Lamprocroton* nas 644 árvores estudadas). Dentre as espécies do grupo externo, tricomas secretores ocorrem também em *C. alabamensis* (seção *Alabamenses*) e em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*). Nas demais espécies estudadas não ocorrem tricomas secretores, inclusive em *C. imbricatus*.

Coléteres (caracteres 4 e 5, Fig. 4): A presença de coléteres foliares foi o estado reconstruído no nó da raiz e da espinha dorsal das 644 árvores analisadas. Em *A. lobata*, estas estruturas distribuem-se por toda a superfície foliar, estando presentes no pecíolo, na região baselaminar/acropeciolar e nas margens da lâmina foliar. Em *B. mamoinha*, os coléteres ocorrem apenas nas margens da lâmina foliar, sendo este também o posicionamento mais comum em *Croton*. Porém em *C. alabamensis*, os coléteres são restritos à região baselaminar/acropeciolar. Em todas as demais espécies de *Croton* estudadas ocorrem coléteres marginais, *C. gnaphalii* e *C. muellerianus* são as únicas exceções. Em *C. pallidulus*, além dos coléteres na margem da lâmina foliar ocorrem coléteres peciolares.

Nectários extraflorais-NEF's (caráter 6, Fig. 4): As reconstruções são equívocas no nó da raiz das 644 árvores analisadas, uma vez que em *A. lobata* não ocorrem NEF's e em *B. mamoinha* verifica-se a presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciolares, não sendo possível definir o estado de caráter para o ancestral comum entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*. O mesmo ocorre na raiz de *Croton*. Neste gênero, NEF's baselaminares/acropeciolares estão presentes nas seções *Cuneati* e *Cleodora*, em *C. burchellii* e em *C. imbricatus*, e em outros clados de *Croton*

não contemplados no presente estudo. A seção *Lamprocroton* é caracterizada pela ausência de NEF's baselaminares/acropeciolaes, sendo este estado reconstruído no nó desta seção para as 644 árvores analisadas. NEF's também não ocorrem em *C. alabamensis* e *C. sacaquinha*.

Laticíferos (caráter 7, Fig. 4): Os resultados sugerem que *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton* evoluíram de um ancestral comum latescente, sendo que laticíferos articulados não ramificados foi o estado reconstruído como o mais parcimonioso no nó da raiz das 644 árvores, estado que se mantém nos nós da espinha dorsal e no nó da raiz de *Lamprocroton*, caracterizando essa seção. No grupo externo, a seção *Cleodora* possui representantes com laticíferos articulados não ramificados (subseção *Sphaerogyni*) e articulados ramificados (subseção *Spruceani*), sendo este último um caráter compartilhado com *Astraea lobata*. Dentre todas as espécies estudadas, a única que não possui laticíferos é *C. alabamensis*.

Esclereídes (caráter 8, Fig. 5): A ausência de esclereídes é o estado reconstruído no nó da raiz de todas as 644 árvores analisadas, estas estruturas não ocorrem no mesofilo de *A. lobata* e de *B. mamoinha*. Este estado é também reconstruído no nó da raiz de *Croton*, porém no nó da raiz de *Lamprocroton* a presença de esclereídes é o estado reconstruído como o mais parcimonioso em 583 das 644 árvores analisadas, havendo 61 árvores com reconstruções equívocas. A presença de esclereídes no mesofilo é marcante em *Lamprocroton*, não ocorrendo apenas em *C. muellerianus* e em *C. dichrous*. Com relação às demais espécies de *Croton* que compõem o grupo externo, esclereídes ocorrem no mesofilo de *C. cuneatus*, *C. heterocalyx*, *C. orinocensis* e *C. fragrans*, estando ausentes em *C. alabamensis*, *C. hemiargyreus*, *C. imbricatus*, *C. sacaquinha* e *C. burchelii*.

Tricomas na face adaxial (caráter 9, Fig. 5): A distribuição dos tricomas da face adaxial é bastante variável em *Croton*, ainda assim, a presença de tricomas lepidotos é o estado reconstruído no nó da raiz deste gênero. Já para a seção *Lamprocroton* não é possível definir qual é o estado ancestral, ocorrendo reconstruções equívocas no nó da raiz deste clado nas 644 árvores analisadas. Na subseção *Argentini* verifica-se a presença de tricomas estrelados nas espécies estudadas. Porém na subseção *Lamprocroton* este caráter é muito variável, sendo possível definir um padrão apenas para o clado formado por *C. erythroxyloides* e *C. myrianthus*, espécies tipicamente lepidotas. Tricomas lepidotos são reconstruídos no nó deste clado nas 278 árvores em que ocorre. O nó do clado (*C. dichrous* (*C. splendidus* (*C. ceanthifolius* (*C. pallidulus*,

C. pseudoadipatus)))) ocorre em 99 das 644 árvores analisadas. Dessas, tricomas simples com raios suprimidos são reconstruídos neste nó em 66 árvores e em 33 árvores ocorrem reconstruções equívocas. Estes tipos de tricomas ocorrem na face adaxial de *C. pallidulus*, de *C. pseudoadipatus* e de *C. ceanothifolius*. Em *C. splendidus* ocorrem tricomas fasciculados e em *C. dichrous* a face adaxial é glabra. No nó do clado (*C. muellerianus* (*Croton* sp. L519 e *Croton* sp. L458)) as reconstruções são equívocas na 644 árvores, uma vez que em *Croton* sp. L519 ocorrem tricomas simples e simples com raio suprimido, *Croton* sp. L458 possui tricomas estrelados e em *C. muellerianus* a face adaxial é glabra. Nas espécies de *Croton* do grupo externo a distribuição dos tricomas na face adaxial é bastante variável, porém verifica-se um predomínio de tricomas lepidotos, os quais ocorrem em *C. alabamensis*, *C. cuneatus*, *C. hemiargyreus*, *C. imbricatus* e *C. burchellii*. Tricomas simples e estrelados ocorrem em *C. heterocalyx*, *C. orinocensis* e em *C. fragrans*. Em *C. sacaquinha* ocorrem tricomas estrelados. Reconstruções equívocas ocorrem no nó da raiz das 644 árvores analisadas, sendo que em *A. lobata* ocorrem tricomas simples e simples com raios suprimidos e em *B. mamoninha* ocorrem tricomas estrelados.

Tricomas na face abaxial (caráter 10, Fig. 5): A presença de tricomas lepidotos na face abaxial das folhas foi o estado reconstruído no nó da raiz de *Croton*, na espinha dorsal e no nó da raiz de *Lamprocroton* nas 644 árvores analisadas. A ocorrência deste tipo de tricoma na face abaxial das folhas é um caráter diagnóstico para *Lamprocroton*, sendo que a única espécie desta seção que não possui este tipo de tricoma é *C. gnaphalii* (subseção *Argentini*). Dentre as espécies do grupo externo, a presença de tricomas lepidotos também é comum, não ocorrendo apenas em *C. heterocalyx*, com tricomas multirradiados, e em *C. fragrans*, com tricomas estrelados. As reconstruções foram equívocas no nó da raiz da árvore, uma vez que *A. lobata* possui tricomas simples e *B. mamoninha* possui tricomas estrelados.

Posição dos estômatos (caráter 11, Fig. 5): Folhas anfiestomáticas correspondem ao estado reconstruído no nó da raiz das 644 árvores analisadas, bem como no nó da raiz de *Croton* e se mantém na espinha dorsal da árvore. Porém no nó da raiz de *Lamprocroton*, as reconstruções foram equívocas em todas as 644 árvores analisadas, uma vez que nesta seção verifica-se um predomínio de espécies com folhas hipoestomáticas. A única exceção se faz para *C. gnaphalii* (subseção *Argentini*). Dentre as espécies do grupo externo, folhas hipoestomáticas também ocorrem em espécies da seção *Cleodora* e em *C. alabamensis*.

Organização do mesofilo (caráter 12, Fig. 5): Mesofilo dorsiventral é o estado ancestral em *Croton* e foi reconstruído no nó da raiz das 644 árvores analisadas, bem como no nó do gênero, em toda a espinha dorsal da árvore e no nó de *Lamprocroton*. Todas as espécies desta seção possuem folhas com mesofilo dorsiventral, sendo este o caráter predominante em *Croton*. Mesofilo isobilateral foi observado apenas em *C. imbricatus* e em *C. burchellii*. Apesar deste estado ocorrer também em *Brasiliocroton mamoinha*, a otimização mostra que o ancestral comum entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea* apresentava mesofilo dorsiventral.

Organização do feixe vascular (caráter 13, Fig. 5): De maneira geral, não é possível verificar um padrão de organização do feixe vascular dentre as espécies de *Croton*. A otimização mostra que o estado ancestral em *Croton* é a ocorrência de feixes vasculares colaterais, o qual foi reconstruído no nó da raiz do gênero nas 644 árvores analisadas, bem como ao longo da espinha dorsal da árvore e no nó de *Lamprocroton*. Porém nesta seção, verifica-se um grande número de espécies com feixes vasculares bicolaterais. No nó da subseção *Lamprocroton* este foi o estado reconstruído em 566 das 644 árvores analisadas. A maioria das espécies desta subseção possuem feixes vasculares bicolaterais, com exceção de *C. splendidus*, *C. ceanothifolius* e *Croton* sp. L519. No nó da raiz da árvore as reconstruções são equívocas, uma vez que em *Astraea lobata* ocorrem feixes vasculares bicolaterais e em *Brasiliocroton mamoinha* ocorrem feixes vasculares colaterais.

DISCUSSÃO

Análises Filogenéticas: molecular e combinadas (Evidência Total)

As árvores resultantes das análises filogenéticas das matrizes A e B mostram que a seção *Lamprocroton* é monofilética. Anatomicamente, *Lamprocroton* pode ser delimitada por espécies cujas folhas possuem tricomas secretores na superfície abaxial, laticíferos articulados não ramificados, mesofilo dorsiventral, idioblastos secretores comumente presentes e voltados estritamente para a face adaxial e ausência de nectários (não ocorre um par de nectários baselaminares/acropetiolares e não ocorrem nectários na lâmina foliar). É importante ressaltar que estes caracteres não são restritos à seção *Lamprocroton*, sendo também observados em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*), e possivelmente em outras linhagens de *Croton* não contempladas no presente estudo. Porém, o conjunto destes caracteres anatômicos contribui com a delimitação de *Lamprocroton*.

Dois clados bem suportados emergem dentro da seção *Lamprocroton*, os quais correspondem à subseção *Lamprocroton* e à subseção *Argentini* delimitadas por Van Ee & Berry (2011). Estes autores destacam a ramificação dos estiletos como a única característica morfológica consistente para separar essas subseções. Anatomicamente também não é possível destacar um grupo de caracteres capaz de distinguir a subseção *Lamprocroton* e a subseção *Argentini*. A presença de caracteres de morfologia externa e interna bem conservados nas subseções de *Lamprocroton* explica a sua topologia politômica nas árvores do presente trabalho e de Van Ee & Berry (2011), o que parece ser resultado de uma evolução correspondente entre suas espécies e reflete um grande número de caracteres homólogos. A seção *Lamprocroton* reúne representantes exclusivamente Sul americanos e possivelmente sofreram pressões seletivas equivalentes ao longo de sua história evolutiva, e como resultado observa-se uma semelhança morfológica, estrutural e molecular remanescentes desse processo.

Croton pygmaeus e *C. gnaphalii* emergem como espécies irmãs formando o clado 1, com alto suporte nas árvores resultantes das análises filogenéticas das matrizes A (100%BS) e B (99%BS), o qual corresponde à subseção *Argentini* (Van Ee & Berry 2011). A presença de idioblastos secretores e ausência de coléteres em *C. gnaphalii* a distingue anatomicamente de *C. pygmaeus*, que possui coléteres nos primórdios foliares e não apresenta idioblastos secretores. Na delimitação da seção *Lamprocroton sensu* Van Ee & Berry (2011), *C. pygmaeus* está circunscrita na subseção *Lamprocroton*, porém esta espécie não foi contemplada nas análises filogenéticas realizadas por esses autores. A subseção *Lamprocroton* é definida por espécies que possuem estiletos bífidos, apresentando 6 topos estigmáticos e a subseção *Argentini* é definida por espécies que possuem os estiletos duas ou mais vezes bífidos, apresentando 12 ou mais superfícies estigmáticas. Em *C. pygmaeus*, a ramificação do estigma ocorre desde a sua porção basal, sendo observadas 6 superfícies estigmáticas. Esta organização do estigma de *C. pygmaeus* difere da observada nas espécies da subseção *Lamprocroton*, nas quais o estigma é bífido e também mostram 6 superfícies estigmáticas, porém possui 3 ramos basais e cada um deles se ramifica em sua porção apical. Desta forma, é sugerido no presente trabalho uma modificação na definição da subseção *Argentini* (Van Ee & Berry 2011) para que a mesma possa englobar *C. pygmaeus*:

Chave de identificação para as subseções de *Croton* seção *Lamprocroton*

1. Estiletes bífidos (ramificação apical) com 6 superfícies estigmáticas subseção *Lamprocroton*
- 1'. Estiletes ramificados desde a base com 6 superfícies estigmáticas, bífidos ou multifídios com 12 ou mais superfícies estigmáticas.....subseção *Argentini*

Observando a distribuição geográfica de *C. pygmaeus*, o seu posicionamento junto às demais espécies da subseção *Argentini* não é surpreendente, uma vez que esta espécie é endêmica do Rio Grande do Sul (Brasil) e distribui-se continuamente às outras espécies desta subseção.

O clado 2 de *Lamprocroton* corresponde à subseção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011) e as árvores geradas pelas matrizes A e B mostram, ainda que com baixo suporte, um clado formado por *C. muellerianus* e *Croton* sp. L519 e L458 que posiciona-se à parte das demais espécies. *C. muellerianus* não possui esclereídes no mesofilo e é a única espécie da subseção *Lamprocroton* que não possui coléteres, estrutura que tem se mostrado como um caráter marcante em *Croton* (Vitarelli 2013, Cap. III e Cap. II). *Croton* sp. L519 e L458, inicialmente identificadas como *C. ceanothifolius* e *C. pseudoadipatus*, respectivamente, mostram uma incompatibilidade no seqüenciamento destes vouchers com o das referidas espécies nos resultados da filogenia. Acredita-se que *Croton* sp. L519 e L458 sejam a mesma espécie e podem corresponder a um novo taxon da subseção *Lamprocroton*, porém novos estudos se fazem necessários para que seja possível confirmar esta hipótese.

Croton ceanothifolius, *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus* e *C. splendidus* formam um segundo subclado dentro da subseção *Lamprocroton* com uma grande politomia entre essas espécies na árvore gerada pela matriz A. Este resultado mostra que os dois marcadores moleculares (ITS e *TrnL-TrnF*) não são suficientes para esclarecer as relações entre essas espécies da subseção *Lamprocroton*. Em trabalhos futuros, o seqüenciamento de outras regiões do DNA deve ser adicionado a essas análises para se verificar a possibilidade de resolver esta politomia. Sugere-se, para essas espécies da subseção *Lamprocroton*, o sequenciamento da região *trnH-psbA* do DNA plastidial, utilizada por Caruzo *et al.* (2011), a qual têm se mostrado bastante informativa devido à elevada variabilidade de seqüências (Kress *et al.* 2005; Lahaye *et al.* 2008).

Ao serem incorporados os caracteres anatômicos (matriz B) verifica-se uma resolução dos ramos na subseção *Lamprocroton*, ainda que com baixo suporte, sendo possível esclarecer ou indicar possíveis interrelações dessas espécies.

A ausência de esclereídes nas folhas de *C. dichrous* justifica o seu posicionamento em um ramo externo à *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. pallidulus*, *C. splendidus*, *C. pseudoadipatus* e *C. ceanothifolius*. As demais espécies são muito semelhantes entre si, o que justifica a politomia ilustrada na árvore consenso resultante da matriz A e o baixo suporte na resolução dos ramos na melhor árvore resultante da matriz B, na qual verifica-se a topologia ((*C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus*) ((*C. ceanothifolius*, *C. splendidus*) (*C. erythroxyloides*, *C. miryanthus*))). Porém, alguns caracteres anatômicos mostram-se diagnósticos para determinadas espécies, como a presença de coléteres peciolares em *C. pallidulus* e a ausência de idioblastos secretores em *C. splendidus*. As demais espécies são estruturalmente muito próximas, sendo possível distingui-las apenas pela organização dos feixes vasculares e pelo tipo de tricoma na face adaxial das folhas. Ainda assim, *C. erythroxyloides* e *C. myrianthus* são muito semelhantes, ambas possuem feixes vasculares bicolaterais e tricomas lepidotos em ambas as faces. Estas duas espécies são estruturalmente distintas apenas pelo formato das esclereídes, que são mais curtas em *C. myrianthus* e pelo grau de desenvolvimento dos idioblastos secretores, que são conspícuos em *C. myrianthus* e muito reduzidos em *C. erythroxyloides*, mostrando-se, nesta espécie, como uma célula que compõe a epiderme da face adaxial e que se distingue das demais pelo seu conteúdo lipídico.

A topologia das árvores resultantes das matrizes A, B e C mostram que *C. imbricatus* emerge em um ramo fora de *Lamprocroton*. Esta espécie é circunscrita na seção *Lamprocroton* (Lima & Pirani 2008) subseção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011), porém o presente trabalho é o primeiro a fazer o seqüenciamento de parte do DNA de *C. imbricatus* e utilizar estes dados moleculares em uma análise filogenética e evidencia a necessidade de recircunscrição de *C. imbricatus* em outra seção. Estes resultados confirmam a hipótese de Vitarelli (2013, Cap. II) de exclusão de *C. imbricatus* de *Lamprocroton*, uma vez que esta espécie possui um par de NEF's baselaminares/acropeciolares, idioblastos volumosos voltados para ambas as faces, mesófilo isobilateral e ausência de tricomas secretores, mostrando-se como uma espécie estruturalmente muito distinta das demais espécies de *Lamprocroton*.

Se *C. imbricatus* não pertence à seção *Lamprocroton*, em qual seção esta espécie deveria ser recircunscrita? A topologia da árvore consenso resultante da matriz C mostra três possíveis posicionamentos para *C. imbricatus*: 1. Esta espécie estaria dentro da seção *Geiseleria* juntamente com *C. polyandrus*. A presença de um par de NEF's sésseis baselaminares/acropeciolaes e de indumentos lepidotos são características em comum entre *C. imbricatus* e espécies de *Geiseleria* (Riina *et al* 2010; Van Ee *et al* 2011). 2. *Croton imbricatus* poderia pertencer à seção *Luntia*, uma vez que as espécies circunscritas nesta seção também apresentam folhas com margem inteira, um par de glândulas baselaminares/acropeciolaes, indumentos lepidotos, além de serem amplamente distribuídas na América do Sul (Webster 1993; Riina *et al* 2010; Van Ee *et al* 2011). Esta espécie deveria ser acrescida ao grupo de *Luntia* que possui folhas não lobadas e sem glândulas na superfície da lâmina foliar (Riina *et al* 2010). 3. Os caracteres destacados acima como semelhantes entre *C. imbricatus* e as seções *Geiseleria* e *Luntia* são simplesiomorfias e não indicam necessariamente uma relação de parentesco entre esses clados, desta forma, não se descarta a possibilidade de que *C. imbricatus* constitua uma seção monoespecífica dentro do universo de espécies conhecidas em *Croton*.

Os dados moleculares utilizados e a amostragem taxonômica limitada no presente trabalho não permitem elucidar de forma definitiva a posição de *c. imbricatus* dentro do gênero *Croton*. Não obstante, os resultados obtidos indicam claramente que esta espécie não pertence à seção *Lamprocroton*, como sugerido por Vitarelli (2013, Cap. II).

O presente estudo indica um provável posicionamento de *C. imbricatus* próximo à *C. polyandrus* e às seções *Luntia* e *Geiseleria*. Van Ee *et al* (2011) ressaltam a importância de estudos que investiguem melhor a circunscrição das espécies nestas duas seções. Estudos complementares se fazem necessários para que qualquer uma das três hipóteses acima seja comprovada ou refutada e para elucidar as reais interrelações de *C. imbricatus* e demais espécies de *Croton*.

Reconstrução do Estado Ancestral

Idioblastos secretores / *Tricomas secretores*: Idioblastos posicionados abaxialmente no mesófilo e tricomas secretores na face abaxial das folhas são estruturas homólogas em *Croton* e as reconstruções destes caracteres mostram que estas estruturas são mutuamente excludentes. Estes resultados também foram evidenciados por Vitarelli

(2013, Cap. II e III). *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton* evoluíram de um ancestral comum que não possuía tricomas secretores nas folhas, mas que apresentava idioblastos secretores no mesofilo. Estes são estados ancestrais em *Croton* e a maioria das linhagens deste gênero parecem ter mantido estas características ao longo de sua história evolutiva, sendo que a presença de tricomas secretores mostra-se como uma sinapomorfia compartilhada por poucas linhagens do gênero, como observado em *Lamprocroton*, *C. sacaquinha* e *C. alabamensis*.

Vitarelli (2013, Cap. II e III) demonstrou que modificações na estrutura e no posicionamento dos idioblastos secretores voltados para a face abaxial são precursores dos tricomas secretores presentes nesta face foliar. A ocorrência de tricomas secretores nas folhas de *C. alabamensis* é um indício de que estas modificações estruturais ocorreram ainda muito precocemente na história evolutiva de *Croton*, uma vez que a seção *Alabamenses* é um clado basal do gênero (Van Ee *et al* 2011) e que *C. alabamensis* constitui uma das linhagens mais antigas dentro do gênero (Van Ee *et al* 2006). É possível concluir o mesmo para a ausência de idioblastos secretores, característica incomum em *Croton*, verificada em *C. alabamensis*, *C. splendidus*, *C. pygmaeus*, *Croton* sp. L519 e *Croton* sp. L458. Verifica-se que em algumas linhagens de *Croton* parece ter ocorrido uma tendência de um menor investimento na estruturação dos idioblastos secretores até a sua completa ausência. Na seção *Lamprocroton* são visivelmente reduzidos, podendo ocorrer em algumas espécies como células que compõem a epiderme e que são reconhecidas apenas pela secreção em seu protoplasto.

Croton imbricatus foi previamente circunscrita na seção *Lamprocroton* (Lima & Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011), porém os resultados do presente trabalho mostram que esta espécie emerge em um ramo fora desta seção. A presença de idioblastos secretores voltados para ambas as faces e ausência de tricomas secretores nesta espécie são alguns dos caracteres que justificam o seu posicionamento fora de *Lamprocroton* e reforçam os resultados da filogenia molecular.

Coléteres: *Astraea*, *Brasiliocroton* e *Croton* evoluíram de um ancestral comum que possuía coléteres foliares. Este é um caráter plesiomórfico compartilhado por esses três gêneros. Coléteres são amplamente distribuídos nas folhas de *A. lobata*, estando presentes no pecíolo, na região baselaminar/acropeciolar e na margem da lâmina. Nas folhas de *Brasiliocroton* e em *Croton*, os coléteres são caracteristicamente marginais. Durante a evolução destes dois gêneros houve um menor investimento na produção dos coléteres, fato que provavelmente ocorreu concomitantemente ao surgimento dos

NEF's. Em sua condição atual, as espécies destes gêneros mostram tipicamente folhas com coléteres marginais e NEF's baselaminares/acropeciulares. A substituição de estruturas secretoras simples por outras mais complexas não é um processo incomum nas plantas e está relacionado à evolução química dos vegetais (Cronquist 1988; Lersten 1975). Os resultados do presente trabalho não mostram uma homologia entre coléteres e NEF's, porém apontam para uma relação entre a história evolutiva dessas duas estruturas secretoras em *Croton*. Estudos que considerem um maior número de espécies e de seções do gênero se fazem necessários para que seja possível confirmar ou refutar uma hipótese de homologia entre coléteres e NEF's.

A presença de coléteres baselaminares/acropeciulares em *C. alabamensis* foi também relatada por Vitarelli (2013, Cap. II) e referem-se às estruturas definidas, nesta espécie, como glândulas rudimentares da base da lâmina foliar (Van Ee *et al* 2006). Os coléteres baselaminares/acropeciulares em *C. alabamensis* e os coléteres peciulares em *C. pallidulus* mostram-se como um caráter relictual que reflete uma condição ancestral. Por outro lado, a ausência de coléteres em *C. gnaphalii* e em *C. muellerianus* é uma apomorfia verificada dentro de *Lamprocroton*.

Nectários extraflorais - NEF's: A presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciulares é comum em *Croton* (Freitas & Paoli 1999; Freitas *et al* 2001; Riina *et al* 2007; Medeiros *et al* 2008; Riina *et al* 2009; Riina *et al* 2010; Caruzo *et al* 2011; Vitarelli 2013, Cap. II e III), sendo esta uma simplesiomorfia compartilhada entre muitas espécies de *Croton*, *Brasiliocroton mamoinha* e uma segunda espécie de *Brasiliocroton* ainda não descrita (Riina *et al. In prep.*). Já em *Astraea lobata* e em *Croton alabamensis* NEF's são ausentes e ocorrem coléteres nesta posição baselaminar/acropeciolar. A seção *Lamprocroton* é caracterizada pela ausência de NEF's, o que também é verificado em *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*). Nestes grupos verifica-se uma redução no investimento em produzir estruturas secretoras, não sendo observados coléteres ou NEF's baselaminares/acropeciulares. É possível que as espécies que compreendem *Lamprocroton* e *Lasiogyne* tenham perdido os NEF's ao longo da história evolutiva. Por outro lado, estas espécies podem ter evoluído a partir de linhagens de *Croton* que nunca chegaram a desenvolver NEF's. Duas linhagens distintas parecem ter evoluído a partir do ancestral comum entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea*: a primeira com coléteres baselaminares/acropeciulares (representada atualmente por *Astraea lobata* e *Croton alabamensis*) e a segunda com NEF's baselaminares/acropeciulares (representada, no presente trabalho, pela seções *Cuneati* e

Cleodora e por *C. burchellii* e *C. imbricatus*). As espécies de *Lamprocroton* e *C. sacaquinha* (seção *Lasiogyne*) podem ter se originado da primeira linhagem, havendo a perda dos coléteres baselaminares/acropeciolaes nestes grupos. Os resultados do presente trabalho mostram que *C. imbricatus*, previamente circunscrita em *Lamprocroton* (Lima & Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011), emerge fora desta seção. A presença de um par de NEF's baselaminares/acropeciolaes nesta espécie reforça esta topologia e demonstra que *C. imbricatus* evoluiu de uma linhagem distinta de *Lamprocroton*. É importante ressaltar que na descrição morfológica de *C. imbricatus*, Lima & Pirani (2008) não mencionam a presença de um par de glândulas na base da lâmina foliar. É possível que o tamanho reduzido das folhas, a densidade de tricomas lepidotos em ambas as faces foliares juntamente com o fato de seus NEF's baselaminares/acropeciolaes serem sésseis tenham mascarado a observação destas estruturas.

Laticíferos: A subfamília Crotonoideae é caracteristicamente latescente, sendo registrados laticíferos não articulados na maioria dos representantes desta subfamília (incluindo espécies de *Croton* e *Astraea*), enquanto que os laticíferos articulados são relatados em poucos gêneros, como em *Manihot* e *Hevea* (Rudall 1994; Wiedenhoeft *et al.* 2009), não tendo sido ainda identificado qual destes tipos corresponde ao estado plesiomórfico para o grupo. Apesar de laticíferos não articulados terem sido observados em 12 espécies de *Croton* (Rudall 1994), em espécies de *Croton* da seção *Cyclostigma* (Wiedenhoeft *et al.* 2009) e em *Croton draco* var. *draco* (Farías *et al.* 2009), laticíferos articulados ocorrem em todas as espécies estudadas no presente trabalho e os resultados apresentados indicam que o ancestral comum entre *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea* possuía laticíferos articulados não ramificados, caráter que se manteve em *Brasiliocroton* e na maioria das espécies de *Croton* estudadas. Os laticíferos articulados ramificados parecem ter evoluído dos não ramificados, cuja evolução se deu muito precocemente, uma vez que este é um caráter compartilhado entre espécies de *Croton* (seção *Cleodora*) e *Astraea lobata*.

Laticíferos não ocorrem em *C. alabamensis*, o que possivelmente não corresponde a uma apomorfia, uma vez que Vitarelli (2013, Cap. II) observou nesta espécie células parenquimatosas com conteúdo denso próximas ao floema, região coincidente com a de ocorrência dos laticíferos e discute que estas células podem representar uma condição ancestral de estruturas secretoras latescentes, uma vez que células parenquimáticas são sugeridas como precursoras dos laticíferos (Scott 1886,

apud Rudall 1994). Laticíferos são aparentemente ausentes em algumas espécies de *Croton* (McPherson & Trel 1987; Rudall 1994), o que parece ser um caráter taxonomicamente relevante dentro do gênero e, sem dúvida, de grande importância nas interpretações filogenéticas. A ausência de laticíferos pode representar uma condição ancestral, como parece ser o caso de *C. alabamensis*, ou pode estar relacionada com a presença de esclereídes, corroborando a hipótese de homologia entre laticíferos e esclereídes (Rudall 1994). Os resultados do presente trabalho não são suficientes para corroborar ou refutar tal hipótese, pois a ocorrência concomitante de laticíferos e esclereídes é comum nas folhas das espécies estudadas. A ocorrência concomitante de laticíferos e esclereídes é também relatada na casca de *Croton draco*, não sendo observado por esses autores nenhuma similaridade morfológica ou fisicoquímica entre essas duas estruturas (Fariás *et al* 2009).

Esclereídes: Croton, Brasiliocroton e Astraea evoluíram de um ancestral comum que não possuía esclereídes. Esclereídes no mesofilo surgiram em distintas linhagens dentro de *Croton* e pode ser considerada como uma sinapormorfia neste gênero. Entretanto, este é um caráter homoplásico que ocorre em clados que não apresentam necessariamente uma relação de proximidade, como *Cuneati*, *Cleodora* e *Lamprocroton*. A presença de esclereídes no mesofilo pode ser resultante de uma convergência adaptativa em resposta ao estresse hídrico, uma vez que em *Croton* estas estruturas estão relacionadas com a capacidade de absorção da umidade atmosférica (Vitarelli, cap. tricomas-esclereídes). As esclereídes estão diretamente conectadas com os tricomas da face adaxial das folhas e formam uma estrutura complexa que funciona como uma via alternativa de entrada e distribuição de água nas folhas (Vitarelli 2013 Cap. I). O que é particularmente interessante em *Lamprocroton* que possui ampla distribuição nos complexos rupestres de altitude, justificando a presença de esclereídes em quase todos os seus representantes. Em *C. muellerianus* e em *C. dichrous* (seção *Lamprocroton*) esta complexa estrutura não ocorre, uma vez que estas espécies são glabras na face adaxial das folhas. Esclereídes parecem ter sido perdidas nestas duas espécies, uma vez que a presença destas estruturas constitui o estado ancestral para *Lamprocroton*. Este é um forte indício de que esclereídes apresentam uma coevolução com os tricomas da face adaxial das folhas em *Croton*. Entretanto, a hipótese contrária não é verdadeira, pois em muitas espécies de *Croton* observa-se a presença de tricomas na face adaxial e ausência de esclereídes no mesofilo.

Os resultados do presente trabalho, bem como os de Vitarelli (2013, Cap III) não são suficientes para corroborar a hipótese de Rudall (1994) de que laticíferos e esclereídes correspondem a estruturas homólogas em *Croton*, uma vez que todas as espécies estudadas possuem laticíferos e em muitas delas estes ocorrem concomitantemente com as esclereídes nas folhas. A única espécie não latescente é *C. alabamensis*, porém nesta espécie as esclereídes também não estão presentes.

Tricomas na superfície foliar: Os resultados do presente trabalho corroboram a hipótese de que *Brasiliocroton* e *Croton* tenham evoluído de um ancestral comum que possuía tricomas estrelados, como discutido por Vitarelli (2013, Cap III) e que os tricomas lepidotos tenham se originado da modificação dos tricomas estrelados a partir de um grau de união cada vez maior dos raios laterais, como sugerido por Webster *et al* (1996). Os resultados do presente trabalho mostram que, se esta hipótese é verdadeira, os tricomas lepidotos surgiram precocemente na história evolutiva de *Croton*, estando presentes em clados basais como o de *C. alabamensis*, e evoluíram em distintas linhagens, constituindo-se num caráter homoplásico no gênero. A seção *Lamprocroton* é tipicamente lepidota (Müller 1873; Pax & Hoffman 1931; Pax 1890; Webster 1993; Lima & Pirani 2008; Van ee & Berry 2011), sendo característico este tipo de tricoma na face abaxial das folhas de suas espécies. Os tricomas da face adaxial apresentam uma distribuição mais variável no gênero, bem como em *Lamprocroton* e são de fundamental importância na taxonomia desta seção, uma vez que as espécies deste clado são estruturalmente semelhantes e a análise do tipo de tricoma presente auxilia na identificação das mesmas. Os tricomas em *Croton* mostram, ainda, grande importância ecológica por estarem associados à absorção da umidade atmosférica, sendo que aqueles da face adaxial comumente estão associados com esclereídes do mesofilo e formam uma estrutura complexa e especializada nesta função (Vitarelli 2013, Cap I).

Posição dos estômatos: Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os de Vitarelli (2013, Cap III) e mostram que *Croton*, *Brasiliocroton* e *Astraea* evoluíram de um ancestral comum cujas folhas eram anfiestomáticas. Caráter que se mantém em muitas linhagens de *Croton*, porém folhas hipoestomáticas aparecem como uma sinapomorfia entre *Lamprocroton*, *Cleodora* e *C. alabamensis*. A evolução deste estado de caráter parece ter ocorrido precocemente no gênero e possivelmente está associada à colonização de ambientes de vegetação mais aberta, nos quais a incidência direta da radiação solar eleva a taxa de transpiração, o que justifica o posicionamento dos estômatos restritos à face abaxial. Desta forma, os estômatos ficam mais protegidos

e consequentemente verifica-se uma menor taxa de transpiração (Dickson 2000; Larcher 2000).

Tipo de mesofilo: A organização dorsiventral do mesofilo é predominante em *Croton* e a relevância taxonômica deste caráter, no gênero, está relacionada com clados em que este tipo de organização não ocorre. Desta forma, a presença de um mesofilo isobilateral nas folhas de *C. imbricatus* é um caráter adicional que justifica a não circunscrição desta espécie em *Lamprocroton*, corroborando a topologia resultante da filogenia molecular.

Organização do feixe vascular: Os resultados do presente trabalho mostram que os tipos de feixes vasculares possuem uma distribuição complexa em *Croton* e concordam com Vitarelli (2013, Cap III) que afirmam que este caráter é muito homoplásico e de pouca relevância filogenética para o gênero. É possível que, em um universo amostral mais abrangente, que considere um maior número de espécies e de seções analisadas, este caráter possa revelar-se como taxonomica e filogeneticamente importante para *Croton*.

CONCLUSÕES

Os caracteres anatômicos têm se mostrado como importantes ferramentas no subsídio das análises filogenéticas em *Croton* e, embora no presente trabalho não tenham sido suficientes para resolver a politomia evidenciada na subseção *Lamprocroton* pela filogenia molecular, estes caracteres foram importantes para indicar as possíveis interrelações entre as espécies ao serem adicionados à matriz de dados moleculares.

A seção *Lamprocroton* é caracterizada pela presença de tricomas secretores na superfície abaxial (caráter incomum no gênero *Croton*), laticíferos articulados não ramificados, mesofilo dorsiventral, idioblastos secretores (pouco conspícuos) comumente presentes e voltados estritamente para a face adaxial e ausência de nectários. O presente trabalho confirma a monofilia da seção *Lamprocroton*, com a remoção de *C. imbricatus* e corrobora a presença de suas duas subseções (*Lamprocroton* e *Argentini*), porém com algumas modificações. *Croton pygmaeus* emerge na subseção *Argentini* juntamente com *C. gnaphalii* e esta subseção passa a englobar espécies com estiletos não ramificados, bífidos ou multifídios, com 6, 12 ou mais superfícies estigmáticas.

Os resultados indicam uma subdivisão da subseção *Lamprocroton* em dois clados, um deles com *C. muellerianus* e *Croton* sp. L458 e L519 e outro com *Croton ceanothifolius*, *C. dichrous*, *C. erythroxyloides*, *C. myrianthus*, *C. pallidulus*, *C. pseudoadipatus* e *C. splendidus*, cujas interrelações devem ser esclarecidas.

Croton imbricatus não faz parte da seção *Lamprocroton* e novos estudos são necessários para elucidar o real posicionamento desta espécie dentro do gênero. Para tanto, sugere-se um estudo anatômico que considere os principais caracteres diagnósticos de *C. polyandrus* e demais espécies possivelmente próximas à *C. imbricatus* (seção *Geiseleria* e seção *Luntia*), os quais devem ser comparados com aqueles de *C. imbricatus* publicados no presente trabalho.

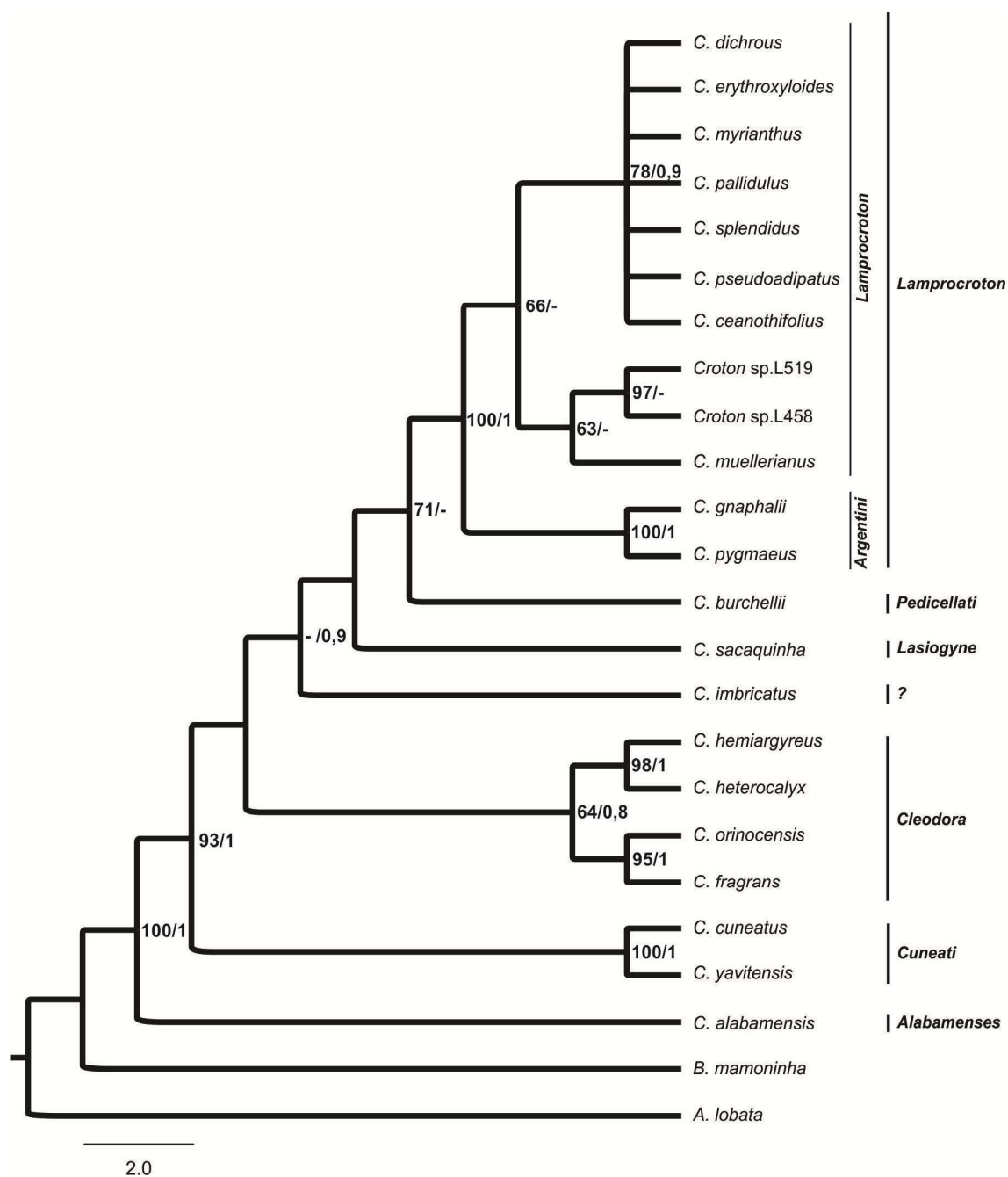


Figura 1. Árvore consenso gerada a partir da análise combinada dos dados moleculares (ITS e trnL-F) (Matriz A) em Máxima Parcimônia. Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap seguidos dos valores de posterior probabilidade que foram plotados na árvore consenso.

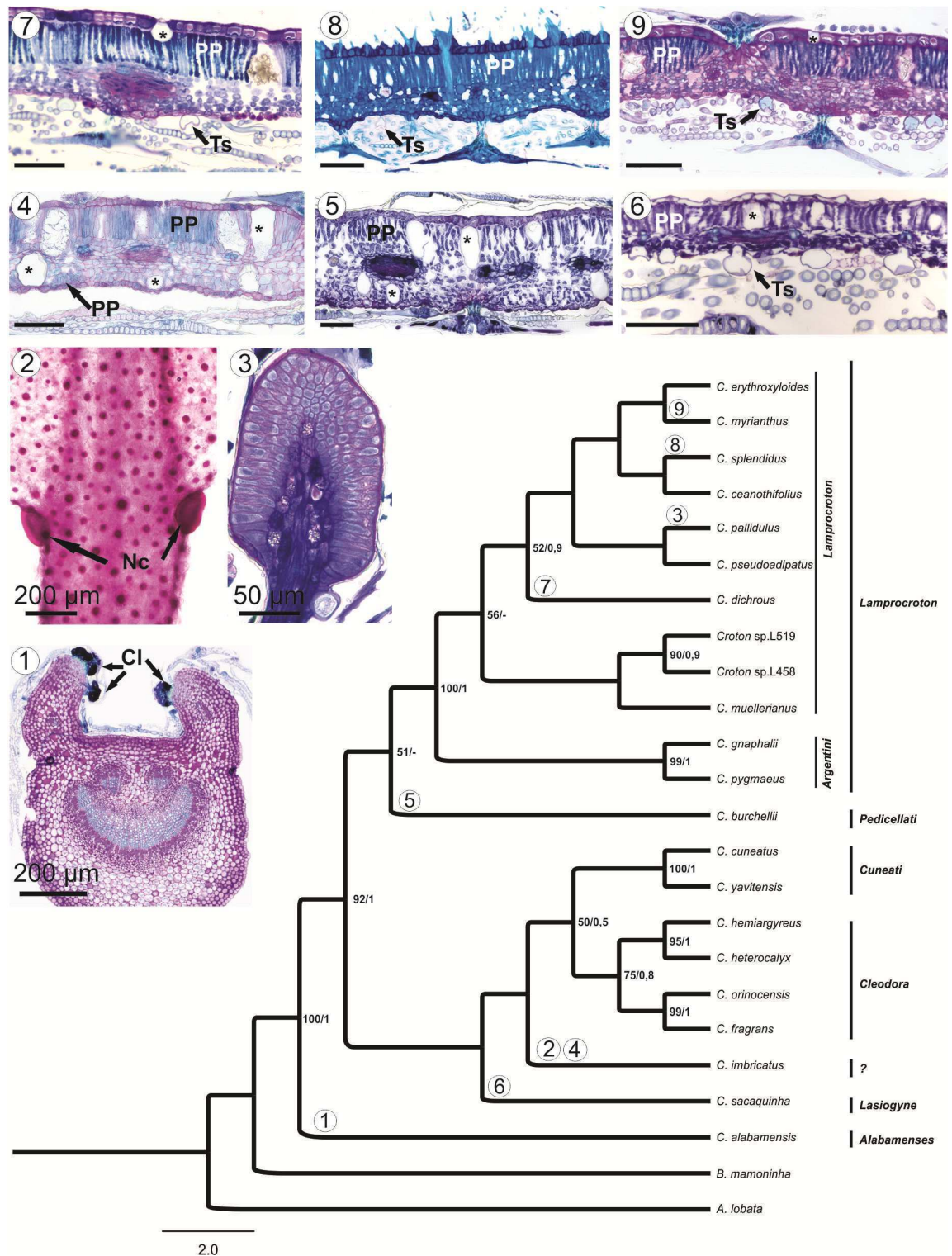


Figura 2. Melhor árvore escolhida a partir da análise combinada dos dados moleculares e anatômicos (Matriz B) em Máxima Parcimônia. Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap seguidos dos de posterior probabilidade que foram plotados na árvore consenso.

1. Secção transversal do pecíolo de *C. alabamensis* incluído em resina e corado com azul de toluidina, evidenciando os coléteres baselaminares/acropetiolares. 2. Par de NEF's acropetiolares/baselaminares em *C. imbricatus*, diafanização. 3. Secção transversal do pecíolo de *C. pallidulus*, evidenciando a presença de coléteres. 4 a 7. Secção transversal de folhas incluídas em resina e coradas com azul de toluidina; barra: 100µm. 4. Ausência de tricomas secretores, idioblastos secretores volumosos voltados para ambas as faces foliares, mesofilo isobilateral em *C. imbricatus*. 5. *C. burchellii*. 6. *C. sacaquinha*. 7. *C. dichrous*, esclereídes ausentes. 8. *C. splendidus*, idioblastos secretores ausentes. 9. *C. myrianthus*. **Asterisco.** Idioblastos secretores. **Cl.** Coléteres. **Nc.** Nectários. **PP.** Parênquima paliçádico. **Ts.** Tricoma Secretor.

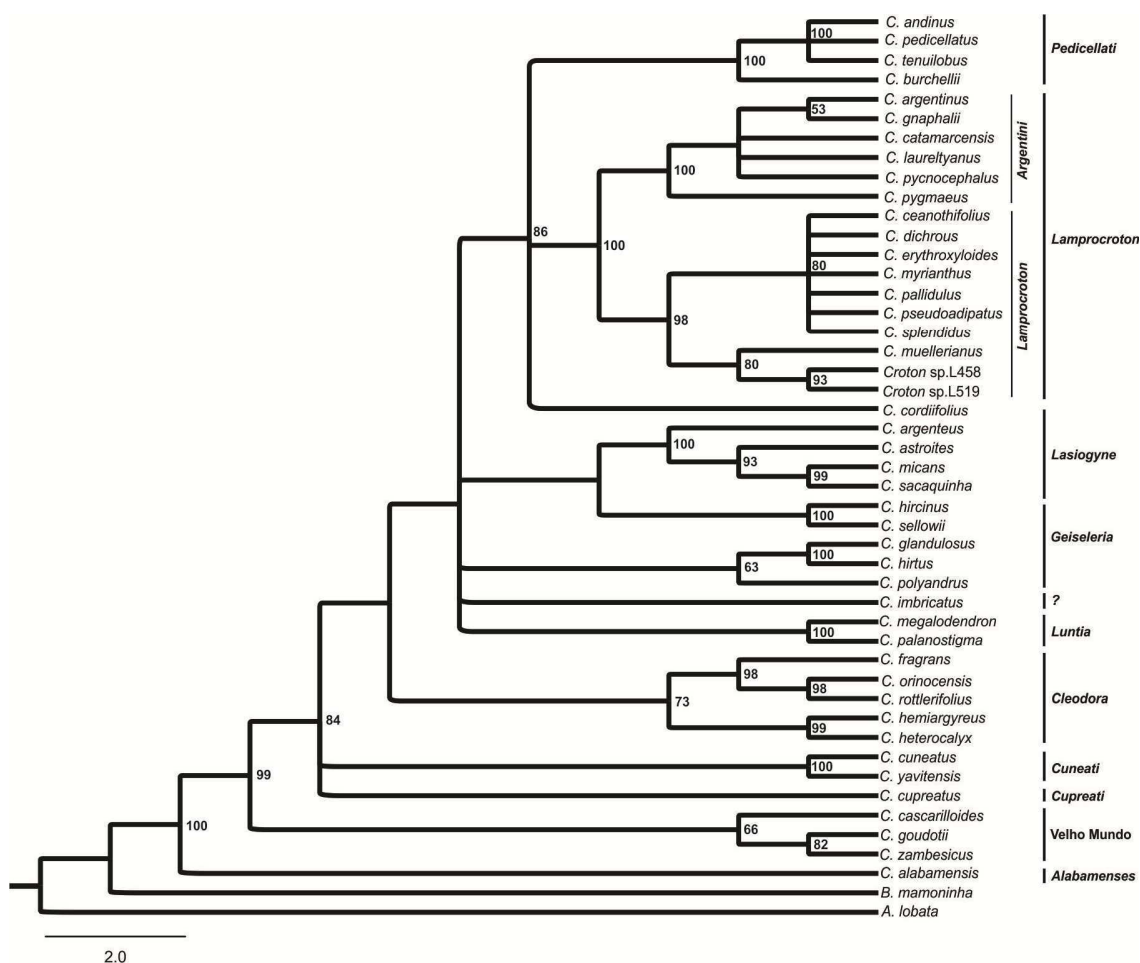


Figura 3. Árvore consenso gerada a partir da análise combinada dos dados moleculares (ITS e trnL-F) em Máxima Parcimônia considerando uma amostragem mais abrangente (Matriz C) . Os números em cada nó são referentes aos valores de porcentagem de bootstrap que foram plotados na árvore consenso.

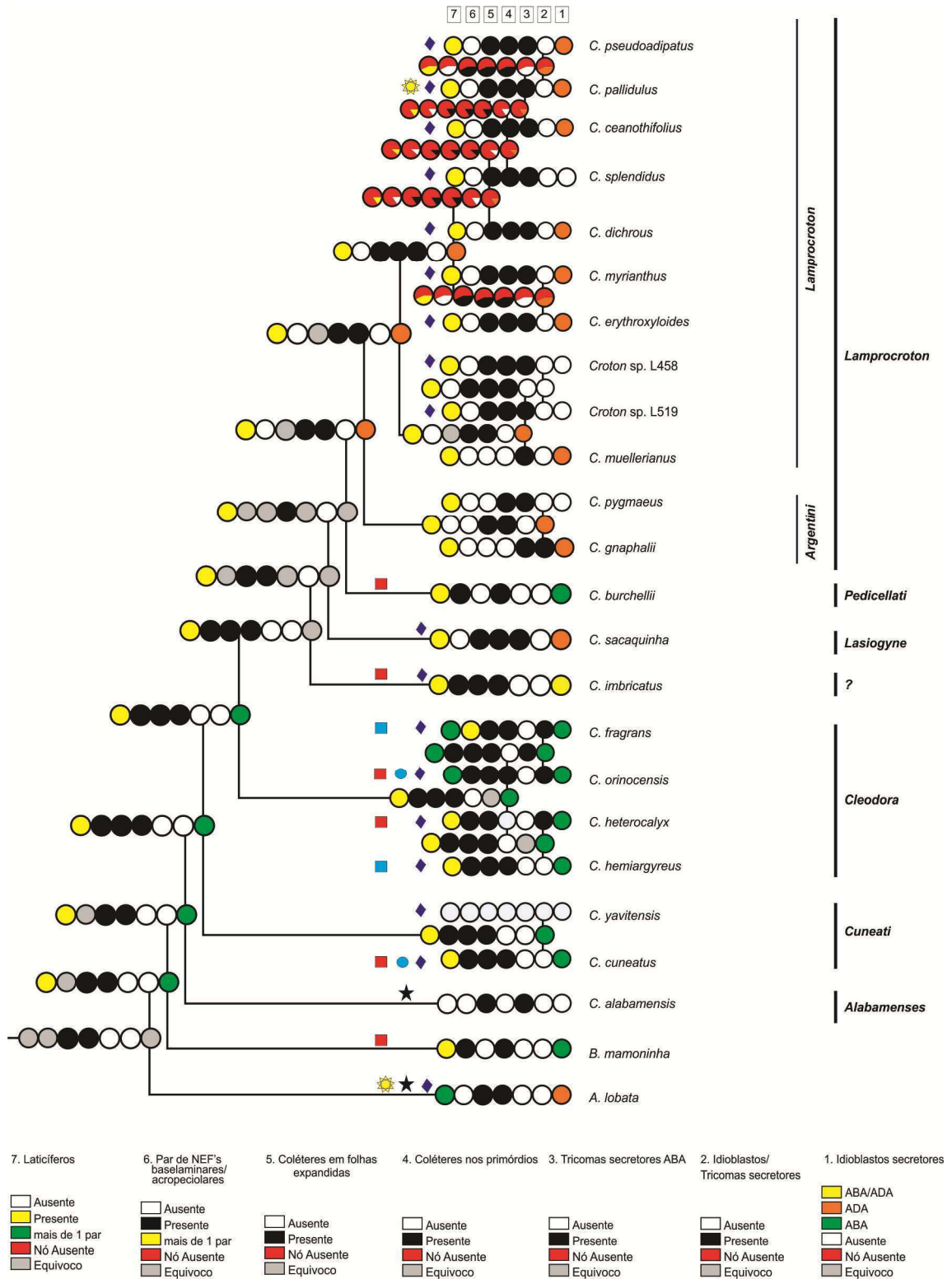


Figura 4. Reconstrução do estado ancestral para (1) Idioblastos secretores (2) Idioblastos secretores em transição para tricomas secretores (3) Tricomas secretores na face abaxial (4) Coléteres nos primórdios foliares (5) Coléteres em folhas completamente expandidas (6) Par de Nectários extraflorais (NEF's) na região baselaminar/acropielar (7) Presença e tipo de laticíferos. A otimização para cada caráter foi estimado através do estado ancestral mais parcimonioso nas 644 melhores árvores selecionadas na análise de Máxima Parcimônia a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram. ♦ coléteres na margem da lâmina foliar completamente expandida. ★ coléteres na região baselaminar/acropielar. ☀ Coléteres peciolares. ● Nectários na margem da lâmina foliar. ■ NEF's com pedúnculo curto ou sésil e superfície secretora convexa. ■ NEF's com pedúnculo longo e superfície secretora côncava.

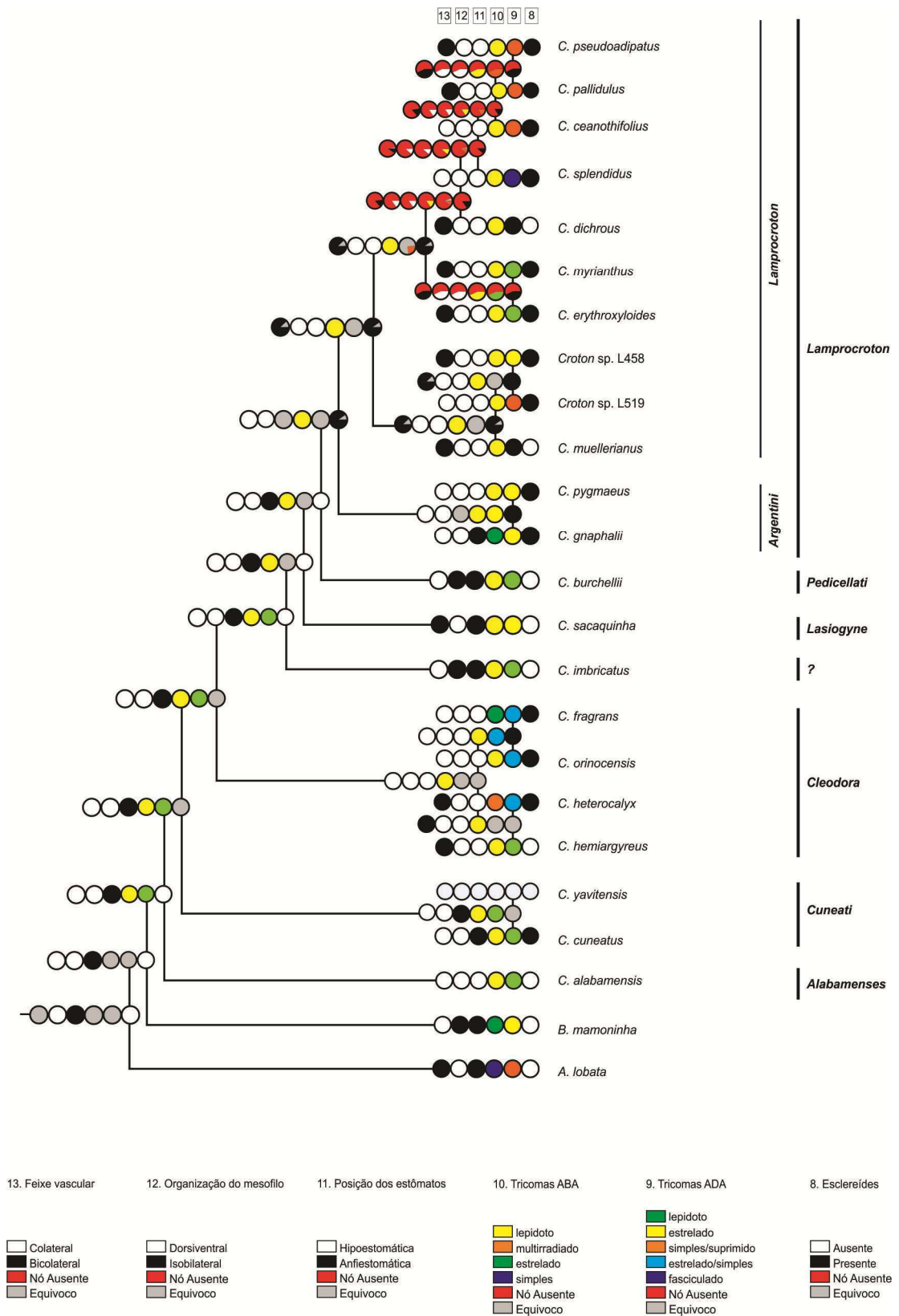


Figura 5. Reconstrução do estado ancestral para (8) Esclereídes no mesófilo (9) Tricomas na face adaxial (ADA) da folha (10) Tricomas na face abaxial (ABA) da folha (11) Posição dos estômatos (12) Organização do mesófilo (13) Organização do feixe vascular. A otimização para cada caráter foi estimado através do estado ancestral mais parcimonioso nas 644 melhores árvores selecionadas na análise de Máxima Parcimônia a partir da combinação dos dados moleculares. Em cada nó está representada a proporção de árvores em que as otimizações indicadas ocorreram.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. IEEE T. **Automat. Contr.** **19**: 716–723.
- Alves, M.V.; Estelita, M.E.M.; Wanderley, M.G.L. & Thomas, W.W. 2002. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 1-9.
- Appezzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2006. **Anatomia Vegetal**. 2 ed. UFV, Viçosa.
- Araújo, J.S.; Azevedo, A.A.; Silva, L.C. & Meira, R.M.S.A. 2010. Leaf anatomy as an additional tool to taxonomy of 16 species of Malpighiaceae found in the Cerrado area (Brazil). **Plant Systematic and Evolution** **286**:117-131.
- Berry, P.E.; Hipp, A.L.; Wurdack, K.J.; VanEe, B. & Riina, R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe *Crotoneae* (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. **American Journal of Botany** **92**: 1520-1534.
- Burger, W. & Huft, M. 1995. Flora costaricensis: Euphorbiaceae. **Fieldiana** **36**: 1-169.
- Caruzo, M.B.R. & Cordeiro, I. 2007. Sinopse da tribo *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s.) no Estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea** **34**: 571-585.
- Caruzo, M.B.R. 2010. **Sistemática de *Croton* sect. *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s.)**. Tese de Doutorado, Departamento de Botânica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- Caruzo, M. B. R.; VanEe, B. W.; Cordeiro, I.; Berry, P. E. & Riina, R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in “Sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **60**: 193-206.
- Chin, Siew-wai , Lutz, S., Wen, J., & Potter, D. 2013. The bitter and the sweet: inference of homology and evolution of leaf glands in prunus (rosaceae) through anatomy, micromorphology, and ancestral-character state reconstruction. **International Journal of Plant Sciences** **174** (1): 27-46.
- Cordeiro, I.; Berrey, P. E.; Caruzo, M. B. R. & Van Ee, B. W. 2008. *Croton laceratoglandulosus* (Euphorbiaceae s.s.), a new glandular-stipulate species from Brazil and Bolivia, and its systematic position based on molecular analysis. **Botanical Journal of the Linnean Society** **158**: 493–498.
- Coutinho, I.A.C.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2010. Ontogenetic, anatomical and histochemical study of the extrafloral nectaries of *Sapium biglandulosum* (Euphorbiaceae). **Australian Journal of Botany** **58**: 224-232.

- Cronquist, A. 1988. **The evolution and classification of flowering plants**. 2ª edición. New York Botanical Garden, Bronx.
- Dickison, W.C. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. Academic Press, USA. 533p.
- Delgado, M.N.; Azevedo, A.A.; Valente, G.E. & Kasuya, M.C.M. 2009. Morfo-anatomia comparada de espécies da subtribo *Coutoubeinae* (Chironieae-Gentianaceae). **Acta Botanica Brasilica** **23**: 956-967.
- De-Paula, O.C., Sajo, M.G., Prenner, G. Cordeiro, I & Rudall, P.J. 2010. Morphology , development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae-Malpighiales). **Plant systematic and Evolution** **292**: 1-14.
- Fisher , D. B. 1968 . Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology** **16**: 92 – 96.
- Freitas, L. & Paoli, A.A.S. 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, A.A.S. 2001. Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **136**: 267–277.
- Goldberg, A. 1986. **Classification, Evolution and Phylogeny of the Families of Dicotyledons**. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Gomes, S.M.A., Silva, E.A.M., Lombardi, J.A., Azevedo, A.A. & Vale, F.H.A. 2005. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia da subfamília Hippocrateoideae (Celastraceae). **Acta Botanica Brasilica** **19**: 945-961.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.** **41**: 95–98.
- Horn, J.W., Fisher, J.B., Tonlinson, P.B., Lewis, C.E. & Laubengayer, K. 2009. Evolution of lamina anatomy in the palm family (arecaceae). **American Journal of Botany** **96(8)**: 1462–1486.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** **17**: 754–755.
- Johansen D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York.
- Judd, W.S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal**. Um Enfoque Filogenético. 3ª Ed. Artmed, Porto Alegre.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **102**: 8369–8374.

- Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Wagner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G., Savolainen, V., 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **105**: 2923–2928.
- Larcher, W. 2000. **Ecofisiologia Vegetal**. Editora Rima, São Carlos. 531p.
- Lersten, N.R. 1975. Colleter types in Rubiaceae, especially in relation to the bacterial leaf nodule symbiosis. **Botanical Journal of Linnean Society** **71**:311-319.
- Lewis, P.O., 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. **Systematic Biology** **50**: 913–925.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** **8**: 21-75.
- Lopes, K.L.B.; Thadeo, M.; Azevedo, A.A.; Soares, A.A. & Meira, R.M.S.A. 2009. Articulated laticifers in the vegetative organs of *Mandevilla atrovioleacea* (Apocynaceae, Apocynoideae). **Botany** **87**: 202-209.
- Mcpherson, G. & C. Tirel. 1987. **Flore de la Nouvelle Calédonie et dépendances**. Euphorbiaceae I. Mus. d'Hist. Nat., Paris.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2006. StocChar: a package of Mesquite modules for stochastic models of character evolution. Version 1.1.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.73. <<http://mesquiteproject.org>>.
- Mantovani, A., Venda, A.K.L., Almeida, V.R., da Costa A.F. & Forzza, R.C. 2012. **Plant Systematic Evolution** **298**: 787-800.
- Medeiros, D. Valle, L.S., & Alves, R.J.V. 2008. Euphorbiaceae nativas de cerrado e campo rupestre da serra de São José, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro** **66** (2): 323-349.
- Meira, R.M.S.A. & Martins, F.M. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore** **27**: 109-112.
- Mello-Silva, R., Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., Motta, L.B., Cattai, M.B., Sasaki, D., Lovo, J., Pita, P.B., Rocini, C., Rodrigues, C.D.N., Zarrei, M. & Chase, M.W. 2011. Five vicarious genera from Gondwana: the Velloziaceae as shown by molecules and morphology. **Annals of Botany** **108**: 87–102.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Vol. I. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1979. **Anatomy of the Dicotyledons: Systematic Anatomy of Leaf and Stem with a Brief History of the Subject**. 2nd. Vol. I. Clarendon Press. Oxford.

- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1983. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2nd. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Müller, J. 1873. *Croton*. Pp. 81-274 In: Martius, C.F.P. von. **Flora brasiliensis**. Vol 11(2). Munich. Vienna & Leipzig.
- Nishida, S. & Werff, H. 2011. An evaluation of classification by cuticular characters of the lauraceae: a comparison to molecular phylogeny. **Annals of Missouri Botanical Gardens** **98**: 348–357.
- O'Brien, T.P. & McCully, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- Pax, F. 1890. Euphorbiaceae. In: **Die Naturl. Pflanzenfamilien** (A. Engler & K. Prantl, eds.). 1 ed., v.3, pars 5, p.1-119.
- Pax, F. & Hoffmann, K. 1931. Euphorbiaceae. In: **Die Naturl. Pflanzenfamilien** (A. Engler & K. Prantl, eds.). 2 ed., v.19c, p.11-233.
- Pecnikar, Z.F., Kulju, K.K.J., Sierra, S.E.C., Baas, P., & Welzen, P.C.V. 2012, **Botanical Journal of the Linnean Society** **169**: 645–676.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253 – 1256 .
- Farias, F.R., Williamson, J.S., Rodríguez, S.V., Angeles, G. & Portugal, V.O. 2009. **American Journal of Botany** **96**(12): 2155–2167.
- Riina, R. 2006. **Molecular Systematics of the Neotropical Dragon's Blood trees *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae)**. Doctoral dissertation. University Of Wisconsin, Madison. Pp. 106.
- Riina, R.; Berry, P.E. & Cornejo, X. 2007. A new species of “sangre de drago” (*Croton* section *Cyclostigma*, Euphorbiaceae) from coastal Ecuador. **Brittonia** **59** (1): 000–000.
- Riina, R.; Berry, P.E. & VanEe, B.W. 2009. Molecular phylogenetics of the Dragon's Blood *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany** **34**(2): 360-374.
- Riina, R.; VanEe, B.W.; Wiedenhoeft, A.C.; Cardozo, A. & Berry, P.E. 2010. Sectional rearrangement of arborescent clades of *Croton* (Euphorbiaceae) in South America: Evolution of arillate seeds an a new species, *Croton domatifer*. **Taxon** **59**: 1147-1160.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** **19**: 1572--1574.
- Rudall, P. 1994. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **81** (2): 270-282.

- Sá-Haiad, B.; Serpa-Ribeiro, A.C.C.; Barbosa, N.C.; Pizzini, D.; Leal, D. de O.; Senna Vale, L. & Santiago-Fernandes, L.D.R. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Systematic and Evolution** **283**: 179-202.
- Sartori, A.L.B. e Tozzi, A.M.G.A. 2002. Comparative feaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-Papilionoideae-Sophoreae) species. **Botanical Journal of the Linnean Society** **140**: 249-259.
- Scatena, V.L.; Cardoso, V.A. e Giulietti, A.M. 1999. Morfoanatomia de espécies de *Blastoculon* Ruhland (Eriocaulaceae). **Acta Botânica Brasileira** **13**: 29-41.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **American Journal of Botany** **29**: 464-471.
- Solereder H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Swofford, D. L. 2002. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)**. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou & J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology** **17**: 1105–1109.
- Thadeo, M.; Cassino, M.F.; Vitarelli, N.C.; Azevedo, A.A.; Araújo, J.M.; Valente, V.M.M. & Meira, R.M.S.A. 2008. Anatomical and histochemical characterization of foliar glands of *Prockia crucis* p. Browne ex. L. (Flacourtiaceae). **American Journal of Botany** **95**: 1515-1522.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**: 1596–1599.
- Thompson, J.D. et al. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** **25**: 4876–4882.
- Tokuoka, T. & Tobe, H. 1998. Ovules and seeds in Crotonoideae (Euphorbiaceae): structure and systematic implications. **Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie** **120**: 165–186.
- Urbatsch, L.E., Baldwin, B.G. & Donoghue, M.J. 2000. Phylogeny of the cone-flowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences and chloroplast DNA restriction site data. **Systematic Botany** **25**: 539–565.
- Van Ee, B.W., Jelinski, N., Berry, P.E., & Hippš, A.L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequence and AFLP data. **Molecular Ecology** **15**: 2735–2751.

- Van Ee, B.W., Berry, P.E., Riina, R. & Gutiérrez Amaro, J.E. 2008. Molecular phylogenetics and biogeography of the Caribbean-centered *Croton* subgenus *Moacroton* (Euphorbiaceae s.s.). **Botanical Review Lancaster** **74**: 132–165.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2009. A phylogenetic and taxonomic review of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) on Jamaica including the description of *Croton jamaicensis*, a new species of section **Eluteria** **Systematic Botany** **34**: 129–140.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2009. The circumscription of *Croton* section *Crotonopsis* (Euphorbiaceae), a North American endemic. **Harvard Pap. Bot.** **14**: 61–70.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2010. Taxonomy and phylogeny of *Croton* section *Heptallon* (Euphorbiaceae). **Systematic Botany** **35**: 151–167.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2010. Typification notes for *Croton* (Euphorbiaceae). **Harvard Pap. Bot.** **15**: 73–84.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2011. *Croton* Section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a Novel New World Group, and a New Subsectional Classification of *Croton* Section *Lamprocroton*. **Systematic Botany** **36(1)**: 88–98.
- VanEe, B.W.; Riina, R. & Berry, P.E. 2011. A revised infragenérico classification and molecular phylogeny of new world *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **60**: 1-33.
- Webster, G.L. 1967. The genera of Euphorbiaceae in the Southeastern United States **Journal Arnold Arboreto** **48**: 303-357.
- Webster, G.L. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **42**: 793-823.
- Webster, G. L.; Del-Arco Aguilar, M.J. & Smith, B.A. 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **121**: 41-57.
- Wiedenhoeft, A.C., Riina, R. & Paul E. Berry. 2009. “Ray-intrusive” laticifers in species of *Croton* section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae). **IAWA Journal** **30 (2)**: 135–148.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.W. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White [eds.], *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, New York, USA. Pp. 315–322.
- Zhou, W. & Xia, Nian-He. 2012. Leaf epidermal features of *Lithocarpus* (Fagaceae) from China and their systematic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **168**, 216–228.

**APÊNDICE I: Número de acesso no GenBank dos taxa estudados (ITS, trnL-F).
 Novas sequências ainda não publicadas no GenBank: #. Missing data: -**

Astrea lobata (L.) Klotzsch EU586945.1, HM044768.1/ ***Brailiocroton mamoninha*** Berry & Cordeiro EU586944.1, EU586998.1/ ***C. alabamensis*** E. A. Smith ex Chapman DQ227515.1, DQ227547.1/ ***Croton andinus*** Müll. Arg. FJ614761.1, FJ614801/ ***C. argenteus*** L. AY971181, AY971272/ ***C. argentinus*** Müll. Arg. EU497729; – / ***C. astroites*** Dryand. EU586901; EU586955/ ***C. burchellii*** Müll. Arg. HM071947.1, – / ***C. cascarilloides*** Raeusch. AY971191, AY971282/ ***Croton ceanothifolius*** Baill. HM071950.1, – / ***C. cordiifolius*** Baill EU586917; EU586971/ ***C. cuneatus*** Klotzsch EU497735.1, AY794698.1/ ***C. cupreatus*** Croizat EU586919, EU586974/ ***C. catamarcensis*** Ahumada HM071949; HM071969/ ***Croton dichrous*** Müll. Arg. HM071952.1, – / ***Croton erythroxyloides*** Baill. # , # / ***C. fragrans*** Kunth. HM044791.1, HM044772.1/ ***C. glandulosus*** L. EU478066; EU497713/ ***C. gnaphalii*** Baill. EU586940.1, EU586994.1/ ***C. goudotii*** Baill EU586946; EU587000/ ***C. hemiargyreus*** Müll. Arg. HM044793.1, HM044774.1/ ***C. heterocalyx*** Baill. HM044794.1, HM044775.1/ ***C. hircinus*** Vent. EU477889; EU478127/ ***C. hirtus*** L’Her. EU478071; EU497715/ ***Croton imbricatus*** L.R. Lima & Pirani # , # / ***C. laureltyanus*** Ahumada HM071953; HM071970/ ***C. megalodendron*** Müll. Arg. EU586942, EU586996/ ***C. micans*** Sw EU586902, EU586956/ ***Croton muellerianus*** L.R. Lima # , # / ***Croton myrianthus*** Müll. Arg. # , # / ***C. orinocensis*** Müll. Arg. HM044799.1, HM044779.1/ ***C. palanostigma*** Klotzsch EU586943, EU586997/ ***C. pallidulus*** Baill. EU586939.1, EU586993.1/ ***C. pedicellatus*** Kunth FJ614766; FJ614804/ ***C. polyandrus*** Spreng HM564093; – / ***Croton pseudoadipatus*** Croizat # , # / ***C. pycnocephalus*** Baill FJ614708; FJ614776/ ***Croton Pygmaeus*** L. R. Lima # , # / ***C. sacaquinha*** Croizat HM044802.1, HM044782.1/ ***C. sellowii*** Baill. HM564095; HM564230/ ***Croton splendidus*** Mart. # , #/ ***C. tenuilobus*** S. Watson FJ614764; FJ614803/ ***C. yavitensis*** EU586918.1, EU586973.1./ ***C. zambesicus*** Müll. Arg. AY971260; AY971341/ ***Croton*** sp. L458 # , # / ***Croton*** sp. L519 # , # .

APÊNDICE II – Caracteres e estados de caráter utilizados na construção da matriz de dados anatômicos

Carácter	Estado de carácter
1. Posição dos idioblastos secretores	(0) Ocorrem voltados tanto para a face abaxial quanto para a face adaxial da folha; (1) Ocorrem voltados somente para a face adaxial (ADA) das folhas; (2) Ocorrem voltados somente para a face abaxial (ABA) das folhas; (3) Ausentes.
2. Estado transitório entre idioblastos secretores e tricomas secretores	(0) Ausente; (1) Presente.
3. Tricomas secretores na face abaxial (ABA) das folhas	(0) Ausente; (1) Presente.
4. Coléteres nos primórdios foliares	(0) Ausente; (1) Presente.
5. Coléteres em folhas completamente expandidas	(0) Ausente; (1) Presente.
6. Par de NEF's baselaminares/acropeciulares	(0) Ausente; (1) Presente; (2) Ocorrência de mais de um par de NEF's baselaminares/acropeciulares.
7.1. Laticíferos	(0) Ausente; (1) Presente.
7.2. Tipo de laticífero	(0) Articulado não ramificado; (1) Articulado ramificado.
8. Esclereídes no mesófilo	(0) Ausente; (1) Presente.
9. Tipo de tricomas face adaxial (ADA) das folhas	(0) Lepidoto; (1) Estrelado; (2) Simples ou simples com raios laterais suprimidos; (3) Estrelados e simples presentes sem que exista a predominância de um sobre outro; (4) Fasciculado. *Esta classificação segue a terminologia de Webster <i>et al</i> 1996).
10. Tipo de tricomas na face abaxial (ABA) das folhas	(0) Lepidoto; (1) Multirradiado; (2) Estrelado; (3) Simples. *Esta classificação segue a terminologia de Webster <i>et al</i> 1996).
11. Classificação da folha com relação à posição dos estômatos	(0) Hipostomática; (1) Anfiestomática.
12. Organização do mesófilo	(0) Dorsiventral; (1) Isobilateral.
13. Organização do Feixe Vascular na região apical do pecíolo	(0) Colateral; (1) Bicolateral.
14. Coléteres ao longo da margem das folhas completamente expandidas	(0) Ausente; (1) Presente. *Caráter, quando presente, representado por um losângulo azul na figura 1.
15. Coléteres na região baselaminar/acropeciolar	(0) Ausente; (1) Presente. *Caráter, quando presente, representado por uma estrela na figura 1.
16. Coléteres no pecíolo	(0) Ausente; (1) Presente. *Caráter, quando presente, representado por um sol na figura 1.
17. NEF's ao longo da margem das folhas	(0) Ausente; (1) Presente. *Caráter, quando presente, representado por um círculo azul na figura 1.
18. Comprimento do pedúnculo do NEF baselaminar/acropeciolar	(0) Séssil; (1) Curto, que apresenta largura menor do que três vezes a largura da cabeça secretora do NEF; (2). Longo, que apresenta largura igual ou maior do que três vezes a largura da cabeça secretora do NEF. *Caracteres (0 e 1), quando presentes, representados por um quadrado vermelho. *Caráter (2), quando presentes, representados por um quadrado azul.
19. Forma da superfície secretora do NEF	(0) Côncava; (1) Convexa. *Caráter (0), quando presentes, representados por um quadrado azul. *Caráter (1), quando presentes, representados por um quadrado vermelho.

Capítulo IV:
**“Estrutura e desenvolvimento ontogenético dos apêndices
foliares em *Croton erythroxyloides* Baill., *Croton pygmaeus*
L.R. Lima e *Croton splendidus* Mart. (Euphorbiaceae): uma
abordagem funcional e ecológica”**

Estrutura e desenvolvimento ontogenético dos apêndices foliares em *Croton erythroxyloides* Baill., *Croton pygmaeus* L.R. Lima e *Croton splendidus* Mart. (Euphorbiaceae): uma abordagem funcional e ecológica

Resumo: foi realizado um estudo anatômico e ontogenético dos indumentos foliares de *Croton erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, espécies amplamente distribuídas nos complexos rupestres de altitude brasileiros. Verificou-se que as estruturas denominadas como tricomas foliares correspondem a emergências por apresentarem uma origem mista a partir do desenvolvimento de células da protoderme e do meristema fundamental. A estrutura completamente formada mostra-se complexa, exibindo uma íntima relação dos indumentos epidérmicos com esclereídes do mesofilo e recebem o nome de apêndices escamiformes em *C. erythroxyloides*, apêndices estrelados em *C. pygmaeus* e apêndices fasciculados em *C. splendidus*. Estes apêndices mostram-se como estruturas adaptadas à absorção de água, apresentando uma porção externa, com as paredes das células dos raios dos indumentos espessa e pectocelulósica, capaz de absorver água por capilaridade, como evidenciado pela absorção de solução de nanquim. A solução penetra no apêndice por via apoplástica e, antes de seguir para o interior da folha, é forçada a assumir a via simplástica quando o apêndice é pedunculado, pois as paredes das células do pedúnculo são recobertas por substâncias lipídicas que impedem o fluxo apoplástico. Esclereídes conectadas à base destes pedúnculos ou dos raios do apêndice recebem a solução e a transporta diretamente para os feixes vasculares ou maximizam a sua distribuição ao longo de todo o mesofilo, em uma função análoga à das extensões de bainha. Estas esclereídes possuem terminações conectadas aos feixes vasculares ou podem atravessar todo o mesofilo. Os apêndices escamiformes apresentam uma estrutura mais complexa e especializada se comparados aos apêndices estrelados e fasciculados, pois apresentam os raios conectados por pontoações nas paredes laterais e ainda um disco de células subradiais de contorno acentuadamente sinuoso e com inúmeras pontoações, mostrando-se estruturalmente mais adaptados ao processo de absorção da umidade atmosférica. Os apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados desempenham uma função fundamental para a sobrevivência das espécies de *Croton* nos campos rupestres e campos de altitudes, ambientes onde a restrição hídrica se faz evidente, e possivelmente são a resposta para o sucesso adaptativo e evolução do gênero nestes ecossistemas.

Palavras chave: tricomas, esclereídes, emergências, ontogenia, campos rupestres, campos de altitude.

INTRODUÇÃO

A morfologia dos tricomas de *Croton* L. (Euphorbiaceae) tem sido utilizada como uma importante ferramenta nas caracterizações taxonômicas em níveis infragenéricos (Bailon 1958, 1864; Müller 1866, 1873; Froembling 1896; Webster 1993; Webster *et al.* 1996; Lima & Pirani 2003; Riina *et al* 2009; Riina & Berry 2010; Caruzo *et al* 2011; Van Ee & Berry 2011) apresentando grande contribuição na sua taxonomia e sistemática, as quais são complexas devido ao grande número de espécies, a diversidade morfológica, a ampla distribuição geográfica e a falta de distintas sinapomorfias morfológicas para as suas seções (Riina 2006).

Com base na diversidade de tricomas em *Croton*, Webster *et al* (1996) propuseram uma classificação que incluiu tipologias que variaram de tricomas estrelados a lepidotos. *Croton erythroxyloides* Baill. *C. pygmaeus* L.R. Lima e *C. splendidus* Mart. pertencem à subseção *Lamprocroton* da seção *Lamprocroton* (Van Ee & Berry 2011), na qual é comum a ocorrência de tricomas lepidotos (Webster *et al* 1996; Lima e Pirani 2008; Van Ee & Berry 2011).

Em *C. erythroxyloides* tricomas lepidotos ocorrem no caule, em ambas as faces foliares, nas inflorescências, brácteas, sépalas e pétalas; *C. pygmaeus* possui folhas com tricomas estrelados na face adaxial e tricomas lepidotos na face abaxial e nos caules, inflorescências e face abaxial de brácteas, sépalas e pétalas; *C. splendidus* é caracterizado por tricomas lepidotos no caule, nas inflorescências, na face abaxial das brácteas, sépalas e pétalas e por suas folhas fortemente discolores, devido à presença contrastante dos tricomas lepidotos na face abaxial e de tricomas fasciculados na adaxial (Lima & Pirani 2008).

Croton erythroxyloides, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, assim como muitos representantes de *Lamprocroton*, são comuns nos planaltos brasileiros com altitudes superiores aos 1.000 metros, ambientes conhecidos como campos rupestres e campos de altitude (Lima & Pirani 2008). Os campos rupestres ocorrem em feições de relevo tabulares compostas por pontões e grandes blocos rochosos desagregados sobre quartzitos e arenitos predominantemente e tem como Domínios Vegetacionais associados o Cerrado e a Caatinga. Os campos de altitude ocorrem sobre geoformas mais arredondadas de rochas graníticas e/ou rochas intrusivas ácidas ricas em sílica e alumínio e tem como Domínio associado a Mata Atlântica (Moreira & Camelier 1977; Caiafa & Silva 2005). Os campos rupestres e de altitude estão sujeitos a condições ambientais extremas como: temperaturas elevadas, geadas, radiação intensa, déficit

hídrico (Safford 1999; Safford & Martinelli 2000) e nutricional (Benites *et al* 2003). Desta forma, as espécies estão submetidas a contínuas pressões seletivas que podem resultar em adaptações morfoanatômicas e/ou fisiológicas (Eames & MacDaniels 1947; Metcalfe 1983; Dickison 2000; Hamba *et al.* 2002).

A importância da utilização dos indumentos de *Croton* como um caráter taxonômico para o gênero é inquestionável, entretanto não existem relatos sobre o papel funcional destes tricomas. É possível que exista uma correlação entre a função desempenhada pelos tricomas e o sucesso adaptativo de *Croton* nos complexos rupestres de altitude? Estudos em Anatomia Vegetal com abordagens que visam correlacionar a estrutura e a função de partes do corpo da planta constituem-se numa importante ferramenta para responder essa questão.

A presente proposta teve como principal objetivo realizar a caracterização anatômica, histoquímica e ontogenética dos tricomas lepidotos, estrelados e fasciculados das folhas de *Croton erythroxylodes*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, respectivamente, com o intuito de investigar o papel funcional destas estruturas e seu possível valor adaptativo para as espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material de estudo e coletas em campo

Foram escolhidas as espécies *Croton erythroxylodes*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus* (seção *Lamprocroton*) por apresentarem diferentes tipos de tricomas, de modo que o presente trabalho contemple o estudo estrutural de tricomas do tipo lepidoto, estrelado e fasciculado.

Foram amostrados ápices caulinares e folhas do 1° ao 5° nó de *Croton erythroxylodes* e de *C. splendidus* coletadas nos campos de altitude do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), Minas Gerais, Brasil, em picos com altitudes acima de 1.700 metros (Toten Deitado e Costa do Mamute). O PESB está situado no Maciço da Mantiqueira na Zona da Mata de Minas Gerais entre os meridianos 42° 20' e 42° 40'S e os paralelos 20° 20' e 21° 00'W (ENGEVIX 1995), o clima regional é do tipo mesotérmico médio - CWb (Köppen 1948), com precipitação anual de 1.300 mm e temperatura média anual de 18°C (ENGEVIX 1995). A presença de neblina enconbrindo os picos do PESB é observada diariamente. Os indivíduos amostrados ocorrem associados com um tapete de gramíneas assentado em um solo incipiente sobre o substrato rochoso. Os picos “Toten Deitado” (1.722 m de altitude) e “Costa do

Mamute” (1.786 m de altitude) são formações da subserra “Serra das Cabeças” que é parte do complexo serrano do PESB. Os indivíduos de *C. erythroxylodes* foram encontrados apenas no pico “Costa do Mamute” e correspondem a arbustos de 1,0 a 1,5 metros de altura, enquanto os indivíduos de *C. splendidus* são arbustos de 1,5 a 2 metros de altura encontrados apenas no pico “Toten Deitado”.

Ramos férteis coletados foram destinados ao Instituto de Botânica de São Paulo para a identificação pela especialista em *Croton* Dra. Inês Cordeiro e posteriormente incorporados ao acervo do herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa, sob registro VIC 33.004, VIC 33.005, VIC 33.006, VIC 33.007, VIC 33.008, VIC 33.009, VIC 33.010, VIC 33.011, VIC 33.012, VIC 33.013 e VIC 33.014).

Foram utilizadas folhas herborizadas de *C. splendidus* a partir de duplicatas gentilmente cedidas pelo herbário HUEMG da Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG/FAVALE (Alvim s/nº - HUEMG 1726/ Alvim 40 - HUEMG 1748), provenientes de coletas nos campos de altitude do Parque Nacional do Caparaó, Minas Gerais, Brasil. O parque Nacional do Caparaó também é parte do Maciço da Mantiqueira e os indivíduos coletados correspondem a arbustos com cerca de 3 metros de altura ocorrendo em uma altitude de 1.861 metros (20°28’49.2”S e 41°49’43.9” W).

Foram utilizadas folhas herborizadas de *C. pygmaeus* provenientes do herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (Falkenberg 6483 - BHCB 29075/Marchett 549 - BHCB 107725). Os indivíduos amostrados são provenientes de coletas no município de Caçapava do Sul no Estado do Rio Grande do Sul e correspondem a arbustos de 1 a 2 metros de altura ocorrentes sobre substrato rochoso.

Microscopia de Luz

Ápices caulinares e folhas do 1º ao 5º nó coletados em campo foram fixados *in loco* em Karnovsky (1965) ou em FAA (ácido acético glacial, formaldeído, etanol 50%, 1:1:18, v/v) (Johansen 1940). O material coletado foi levado para processamento no Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, onde foi submetido a vácuo em dessecador durante o processo de fixação (48 horas) e estocado em etanol 70%. As folhas obtidas a partir das exsicatas foram submetidas à reversão da herborização (Smith & Smith 1942), desidratadas em série etílica, estocadas em etanol 70% para posterior processamento (Meira & Martins 2003). Parte das amostras foi desidratada em série etílica e incluída em hidroxietilmetacrilato (Historesin, Leica Instruments, preparado conforme instruções do fabricante). As amostras foram seccionadas no plano transversal e longitudinal com 5 µm de espessura, em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155,

Leica Microsystems Inc.) com utilização de navalhas de vidro descartáveis. Os cortes foram corados com azul de toluidina pH 4,0 (O'Brien & McCully 1981).

Para o estudo dos caracteres de superfície foi feita a dissociação epidérmica de fragmentos foliares utilizando-se ácido nítrico e ácido crômico (Jensen 1962). O sobrenadante residual na solução, que corresponde ao material celular do mesofilo e fragmentos rompidos dos apêndices epidérmicos, foi pipetado e analisado separadamente, permitindo a visualização de células isoladas.

Foram realizados testes histoquímicos (Tabela 1) em amostras frescas ou fixadas do material botânico. Todos os testes foram acompanhados de seus respectivos testes controle e do 'branco', que corresponde a secções do material sem submissão a qualquer tipo de reação, visando a observação do aspecto e da coloração natural da secreção. Os testes histoquímicos realizados visaram a identificação dos principais componentes da parede das células que compõem os indumentos das espécies em estudo. Desta forma, para a detecção de lipídeos totais, amostras de folhas foram submetidas ao Sudan IV (Pearse 1980) e ao Vermelho Neutro (Kirk 1970), este último sob indução de fluorescência. Dentro do grupo dos compostos fenólicos, foi feita a reação com o floroglucinol para a identificação de ligninas (Johansen 1940). Para o grupo dos polissacarídeos, utilizou-se o Vermelho de Rutênio (Johansen 1940) para a detecção de pectinas. Para a detecção de proteínas totais, as amostras foram submetidas a reação ao Ponceau de Xilidina (XP) (O'Brien & McCully 1981).

Teste de absorção foliar

Com o objetivo de se verificar a capacidade de absorção de solução aquosa pelos apêndices observados, folhas inteiras foram seccionadas na base do pecíolo e mergulhadas em tinta nanquim diluída em solução aquosa durante um período de 4 horas. Para isto, a folha foi imersa em béquer contendo a solução com nanquim, ficando suspensas pelo pecíolo, o qual foi fixado ao béquer por fita adesiva. Deste modo, apenas a porção médio-apical da folha esteve em contato com a solução.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As folhas coletadas para microscopia eletrônica de varredura foram fixadas em solução contendo glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (4%) em tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (Karnovsky, 1965). Após desidratação em série etílica, o material foi submetido ao ponto crítico (modelo CPD 020, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), utilizando CO₂ (Bozzola & Russel, 1992). Os fragmentos foram cobertos com ouro em metalizador (modelo FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), de acordo com Silveira (1989). A

captura de imagens foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura com câmera digital acoplada (modelo Zeiss, LEO 1430 VP, Cambridge, United Kingdom) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

A caracterização dos tricomas observados seguiu a classificação de Webster *et al* (1996).

RESULTADOS

Foram observados três tipos de indumentos nas folhas das espécies estudadas: os apêndices escamiformes, os apêndices estrelados e os apêndices fasciculados. Nas folhas de *Croton erythroxyloides*, os apêndices escamiformes estão presentes em ambas as faces. Em *C. pygmaeus* e em *C. splendidus* apêndices escamiformes ocorrem apenas na face abaxial, enquanto na face adaxial de *C. pygmaeus* e *C. splendidus* ocorrem apêndices estrelados e fasciculados, respectivamente.

Nas três espécies os apêndices escamiformes são densamente distribuídos e visíveis à vista desarmada. Diferenciam precoce e assincronicamente, sendo possível observar nos meristemas e primórdios foliares desde estádios iniciais até estruturas completamente desenvolvidas.

Desenvolvimento ontogenético dos apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados

O início do desenvolvimento dos apêndices escamiformes é marcado pela presença de uma célula protodérmica que se destaca pelo maior volume, núcleo evidente e citoplasma denso (Fig. 1). Células protodérmicas adjacentes a esta sofrem divisões anticlinais (Fig. 2), formando uma protuberância comumente reconhecida pela presença de 3 células (Fig. 3), na qual a célula central aumenta em volume enquanto as laterais sofrem sucessivas divisões anticlinais (Figs. 3 a 6). Estas células laterais distribuem-se radialmente com relação à célula central e, ao alongarem-se, formarão os raios laterais da estrutura. Estas células dos raios apresentam o núcleo periférico voltado para a porção externa (Figs. 5 e 6), indicando que o processo de alongamento celular ocorre no sentido distal. Nos apêndices escamiformes, os raios laterais matem-se unidos e formam a ala da estrutura. Concomitantemente ao processo de alongamento das células dos raios, células protodérmicas posicionadas logo abaixo destes, tornam-se mais volumosas e darão origem a um disco de células subradiais (Figs. 5 a 8). Abaixo deste disco, células da protoderme e do meristema fundamental sofrem divisões periclinais formando um pedúnculo multisseriado (Figs. 3 a 7). No centro deste, as

células derivadas do meristema fundamental alongam-se e tornam-se precursoras de esclereídes (Figs. 6 e 8). Estas conectam toda a porção externa do apêndice aos tecidos vasculares ou atravessam todo o mesofilo e promovem um contínuo entre os apêndices presentes nas duas faces da folha (Figs. 9 a 13). Durante a sua expansão, as células dos raios iniciam um processo de espessamento de suas paredes, porém sem sofrer lignificação, como mostra a reação negativa ao teste com a floroglucina (Tabela 1). A reação positiva ao vermelho de rutênio indica que as paredes dos raios laterais permanecem pectocelulósicas mesmo nas estruturas maduras (Tabela 1). Já as paredes da célula central se espessam e sofrem lignificação (Tabela 1). Tanto as células dos raios quanto a célula central morrem ao final do processo.

Nos apêndices escamiformes completamente formados, a célula central aparece como uma região circular no centro da estrutura (Figs. 14 e 15), apresentando uma porção aparentemente mais permeável no centro, onde a parede periclinal externa é menos espessa do que as paredes anticlinais, que são lignificadas e pontoadas. A célula central é envolta por uma ala formada pela união das células dos raios laterais (Fig. 16), cujas paredes anticlinais possuem pontoações ao longo de toda sua extensão (Fig. 17). Na região subradial (ou subalar) ocorre um disco de células de contorno acentuadamente sinuoso e paredes espessas (Figs. 16 a 18), apresentando pontoações areoladas (Fig. 18). Estas células do disco subradial se mantêm metabolicamente ativas em sua maturidade, apresentando muitos cloroplastos (Fig. 15). Toda essa estrutura é sustentada por um pedúnculo de comprimento variável, sendo pouco desenvolvido nos apêndices que ocorrem na superfície adaxial das folhas (Figs. 8, 9 e 11). Uma densa camada lipídica é depositada sobre a superfície das paredes anticlinais e periclinal externa das células que compõem a porção mais externa do pedúnculo (Figs. 11, 14 e 15), como evidenciado pela reação positiva ao sudan IV (luz visível) e ao vermelho neutro (sob fluorescência). Já, a porção interna do pedúnculo é composta por esclereídes do mesofilo que se conectam aos feixes vasculares (Fig. 9). O apêndice completamente formado é caracterizado por três regiões: uma porção externa formada pela célula central e raios laterais, uma região mediana composta pelas células do disco subradial e uma porção basal formada pelas esclereídes e por um pedúnculo de comprimento variável.

O desenvolvimento ontogenético dos apêndices estrelados observados em *C. pygmaeus* e dos apêndices fasciculados em *C. splendidus* é semelhante ao descrito para os apêndices escamiformes. Inicialmente, um grupo de células da protoderme se destaca

pelas divisões anticlinais intensas, formando uma protuberância (Fig. 19). A célula central da protuberância é mais volumosa e as adjacentes se dividem anticlinalmente, circundando a célula central (Fig. 20). A célula central se alonga e se projeta para fora da superfície epidérmica, destacando-se das demais da protuberância, e forma o raio porrecto central (Fig. 21). As células que circundam o raio porrecto também se alongam e originam os raios laterais (Fig. 22), os quais são mais curtos do que o raio porrecto e são inclinados nos apêndices fasciculados (Figs. 23 e 24) e, nos apêndices estrelados, dispõem-se todos em um mesmo plano formando um ângulo reto com o raio porrecto. Tanto nos apêndices estrelados de *C. pygmaeus* quanto nos apêndices fasciculados de *C. splendidus* estes raios laterais não apresentam nenhum grau de união entre si e não formam, portanto, uma ala como descrito para os apêndices escamiformes. Em sua maturidade, as paredes das células do raio são espessas. Os apêndices fasciculados possuem paredes desigualmente lignificadas, sendo que na porção basal destas células a parede se lignifica enquanto na porção apical permanece pectocelulósica (Tabela 1, Fig. 10). Os apêndices estrelados e fasciculados são sésseis ou apresentam um pedúnculo muito reduzido. Os raios parecem estar diretamente conectados com esclereídes no mesofilo que se diferenciam a partir de células do meristema fundamental. Assim como nos apêndices escamiformes, as esclereídes também se conectam diretamente ao sistema vascular da folha (Fig. 12) ou atravessam o mesofilo intercomunicando os apêndices de ambas as faces foliares (Fig. 10).

Absorção da solução de nanquim

Foi demonstrada a capacidade de absorção foliar após o contato com a solução de nanquim. Após imersão parcial das folhas em nanquim diluído em água destilada foi possível observar a presença do corante enegrecido nas células dos raios e do disco subradial dos apêndices, no xilema e no parênquima clorofiliano, evidenciando a penetração da solução nos tecidos internos da folha a partir do contato direto da solução com a superfície da lâmina foliar.

Tabela 1: natureza química das substâncias encontradas na parede celular de distintas regiões dos apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados observados em *Croton erythroxylodes*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, respectivamente.

Região do apêndice	Natureza química da substância	Resultado da reação
Células do raio	Lipídios	(-) apêndices escamiformes; (-) apêndices estrelados; (-) apêndices fasciculados
	Lignina	(-) apêndices escamiformes; (+) apêndices estrelados, na região basal dos raios; (+) apêndices fasciculados, na região basal dos raios
	Pectina	(+) apêndices escamiformes; (+) apêndices estrelados; (+) apêndices fasciculados
Célula central	Lipídios	(-) apêndices escamiformes
	Lignina	(+) apêndices escamiformes
	Pectina	(-) apêndices escamiformes
Células do disco subradial	Lipídios	(-) apêndices escamiformes
	Lignina	Inconclusivo, devido à coloração acastanhada natural destas células
	Pectina	(+) apêndices escamiformes
Parede das células do pedúnculo	Lipídios	(+) apêndices escamiformes
	Lignina	(-) apêndices escamiformes
	Pectina	(+) apêndices escamiformes
Esclereídes	Lipídios	(-) apêndices escamiformes; (-) apêndices estrelados; (-) apêndices fasciculados
	Lignina	(-) apêndices escamiformes; (-) apêndices estrelados; (-) apêndices fasciculados; ou levemente lignificada em todos os três tipos
	Pectina	(+) apêndices escamiformes; (+) apêndices estrelados; (+) apêndices fasciculados

DISCUSSÃO

Apêndices Escamiformes, Estrelados e Fasciculados

No desenvolvimento dos três tipos de indumentos descritos observou-se a participação da protoderme e do meristema fundamental, esta origem mista mostra que esses indumentos correspondem a emergências e não a tricomas como descrito por Webster *et al* (1996). Possivelmente, esta origem mista ocorre nos indumentos das demais espécies de *Croton* em que existe uma conexão direta com as esclereídes do mesofilo. Aos tricomas lepidotos, tricomas estrelados e tricomas fasciculados, de *C. erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, sugere-se a denominação de apêndices escamiformes, apêndices estrelados e apêndices fasciculados, respectivamente. A denominação destes indumentos como apêndices não elimina, em absoluto, a utilização da classificação dos tipos de tricomas proposta por Webster *et al* (1996), a qual tem grande relevância para a taxonomia de *Croton* e vem sendo adotada pelos pesquisadores do gênero.

A maioria dos representantes da subfamília Crotonoideae apresenta tricomas estrelados ou lepidotos (Solereder 1908; Metcalfe & Chalk 1950), porém em *Croton* existe uma grande diversidade de tricomas, tendo sido descritas outras tipologias (Webster *et al* 1996). Os tricomas lepidotos são anatomicamente semelhantes às escamas devido a união dos raios laterais que formam uma ala, a qual pode estar parcial ou total unida. Assim, os indumentos observados na face abaxial e adaxial de *C. erythroxyloides* e na face abaxial de *C. pygmaeus* e *C. splendidus* foram denominados de apêndices escamiformes os quais correspondem aos tricomas do tipo lepidoto-subinteiros (Webster *et al* 1996), os quais, na face abaxial das folhas destas três espécies, ocorrem associados com outros tipos de tricomas lepidotos em que há menor grau de união dos raios laterais. Os apêndices estrelados observados em *C. pygmaeus* são correspondentes aos tricomas estrelados com raio porrecto (Webster *et al* 1996), nos quais os raios laterais encontram-se em um único verticilo e em um mesmo plano. E finalmente, os apêndices fasciculados observados em *C. splendidus* são correspondentes aos tricomas fasciculados (Webster *et al* 1996), os quais diferem dos tricomas estrelados pelo posicionamento inclinado dos raios laterais.

Significado funcional dos apêndices foliares

A estrutura dos apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados sugere uma função correlacionada com a absorção de água. Estes apêndices parecem constituir uma

importante via de entrada de água nas folhas, através da absorção da umidade atmosférica, apresentando um papel fundamental na interface planta-atmosfera.

O experimento com a solução de nanquim confirmou a capacidade de absorção dos três tipos de apêndices estudados. Experimentos semelhantes foram feitos utilizando-se outros tipos de soluções que também funcionam como corante, como o fluorocromo sulfato de berberina (Heide-Jørgensen 1990) ou a solução de safranina aquosa (Milanez & Machado 2008), que evidenciaram a permeabilidade dos tricomas e esclereídes pela penetração dos corantes no mesofilo e nos tecidos vasculares. O transporte apoplástico entre a superfície foliar e os tecidos vasculares foi verificado em *Mycrolepis oleaefolia* (D.C) Triana (Melastomataceae) pela solução de safranina aquosa. Nesta espécie foi verificada a presença de estruturas com origem mista (protoderme e meristema fundamental) denominadas como emergências, cuja base é formada por esclereídes no mesofilo que alcançam o sistema vascular da folha (Milanez & Machado 2008). Assim como descrito para *Croton*, os raios da estrutura possuem paredes espessas e não lignificadas. Milanez & Machado (2008) descrevem que essas paredes possuem um aspecto labiríntico, apresentando pequenas projeções irregulares voltadas para o protoplasto, as quais parecem estar associadas ao processo de transporte de solução.

Os apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados em *Croton* são estruturalmente complexos e sua função parece estar relacionada à absorção de água. Os raios dos apêndices aumentam a área de contato com o meio externo, ampliando a superfície de captação da umidade atmosférica. Os apêndices escamiformes mostram-se particularmente mais especializados nesta função, uma vez que a união de seus raios laterais forma um escudo com maior área de contato com o meio. As paredes das células dos raios são espessas, porém são não lignificadas. A natureza pectocelulósica das paredes destas células permite que a água proveniente da umidade atmosférica se difunda por via apoplástica e penetre na estrutura.

Nos apêndices escamiformes, as paredes laterais das células do raio estão conectadas e são pontoadas ao longo de toda a sua extensão, permitindo uma intensa comunicação entre as mesmas. Sugere-se que a água absorvida seja distribuída radialmente por toda a estrutura da ala do apêndice, confluindo em direção a sua porção central (célula central). A célula central dos apêndices escamiformes apresenta pontuações que permitem comunicação com as células do raio. Esta célula central aparentemente também funciona como via de absorção de água, assemelhando-se a um

poro, no qual a parede periclinal externa demonstra ser mais permeável do que as paredes anticlinais que são lignificadas e pontoadas. Finalmente, além dos raios laterais e da célula central, uma terceira via potencial de absorção de água nos apêndices são as células que compõem o disco subradial, as quais permanecem vivas na maturidade, apresentam paredes espessas, densamente pontoadas e um contorno acentuadamente sinuoso que permite aumentar a área superficial de contato com o meio externo. Estas células lembram as traqueídes modificadas presentes no tecido de transfusão de algumas Gimnospermas (Mohl 1871), tendo sido verificada a presença de pontoações areoladas nestas células que formam o disco subradial.

A água absorvida por essas três vias (células do raio, célula central e células do disco subradial) segue por via apoplástica em direção ao interior da folha pelo pedúnculo. As células que compõem o pedúnculo apresentam paredes impregnadas por substâncias de natureza lipídica, conseqüentemente só é possível a absorção via simplasto, impedindo a continuidade da rota apoplástica da água e dos nutrientes. Esta mudança de rota apoplástica para simplástica é de fundamental importância para que ocorra seletividade da solução absorvida e que será levada para os tecidos internos da folha. Os apêndices estrelados e fasciculados são sésseis ou curto pedunculados, porém a porção basal da parede dos raios é lignificada e pode funcionar como uma barreira física à continuidade da via apoplástica.

A solução absorvida penetra para o interior do mesofilo através das esclereídes, as quais se comunicam diretamente com o sistema vascular da folha ou atravessam todo o mesofilo e intercomunicam os apêndices das duas faces. Acredita-se, portanto, que os apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados estejam relacionados com a absorção de água e maximizem a distribuição desta água dentro da folha. As esclereídes parecem ter uma função semelhante às extensões de bainha do feixe vascular.

A estrutura dos apêndices de *Croton erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus* é semelhante à estrutura dos tricomas de algumas xerófitas descritas por Fahn (1986), os quais também estão relacionados com a função de absorção da umidade atmosférica e possuem substâncias lipídicas impregnadas nas paredes de suas células basais. O autor discute que a cutinização ou suberificação desta região dos tricomas desempenha uma função semelhante a da endoderme, obrigando a mudança da rota apoplástica pela rota simplástica do que está sendo absorvido. Estrutura semelhante foi também observada nos tricomas absorventes em espécies da subtribo Pleurothallidinae da família Orchidaceae (Pridgeon 1981).

Nos apêndices de *Croton* estudados, o pedúnculo é a região em que ocorre essa seletividade da solução absorvida. Esta função poderia ser atribuída também às células do disco subradial, uma vez que estas são as únicas células do apêndice que se mantêm vivas e metabolicamente ativas, entretanto não há nenhuma barreira física que impeça a continuidade da absorção via apoplásto por estas células. A presença de plastídios nas células do disco subradial é um indício da possível função desempenhada por elas, as quais podem ser responsáveis por realizar movimentos que modifiquem a angulação dos raios laterais dos apêndices, sendo responsáveis pela maior abertura ou fechamento dos raios de acordo com a umidade atmosférica, como ocorre nas escamas de Tillandsioideae (Benzing *et al* 1976). Estudos complementares para um maior conhecimento acerca da ultraestrutura e do metabolismo fisiológico das células do disco subradial se fazem necessários para confirmar a hipótese de que estas células estejam relacionadas com a movimentação dos raios dos apêndices em *Croton* e de como este processo ocorre.

De maneira geral anatomicamente os apêndices escamiformes das folhas de *C. erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, são estruturalmente semelhantes às escamas das folhas de espécies de Tillandsioideae (Tomlinson 1969; Benzing *et al* 1976), porém nestas, as células do pedúnculo (chamadas de células do domo) são vivas e apresentam uma ultraestrutura complexa com invaginações da membrana plasmática e numerosas mitocôndrias, sendo especializadas na função de absorção (Benzing *et al* 1976) enquanto em *Croton* as células do pedúnculo são especializadas na função de seletividade da solução absorvida. Os apêndices escamiformes de *Croton* exibem uma maior complexidade estrutural quando comparados às escamas de espécies de Tillandsioideae devido à presença das células do disco subradial e das esclereídes que maximizam a distribuição da solução absorvida no interior da folha.

A função de absorção de água desempenhada pelos apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados pode estar relacionada com o sucesso adaptativo das espécies de *Croton* em ecossistemas com restrição hídrica. As três espécies de *Croton* estudadas são tipicamente de ocorrência em campos rupestres e campos de altitudes brasileiros, ambientes nos quais a restrição hídrica se faz evidente pela baixa retenção de água nos solos, devido à presença afloramentos rochosos e de um relevo acidentado (Safford 1999; Safford & Martinelli 2000; Benites *et al* 2003; Caiafa & Silva 2007). Ainda que os complexos rupestres de altitude sejam caracterizados pela escassez de água no solo, existe um grande aporte hídrico e nutricional atmosférico proveniente das neblinas que

são constantes nestes ambientes durante todo o ano. Espécies que são capazes de aproveitar essa fonte, como parece ser o caso de *Croton erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*, sem dúvida possuem uma vantagem adaptativa nestes ecossistemas.

Espécies circunscritas em seções de *Croton* com distribuição predominante em ecossistemas florestais também exibem esclereídes associadas com os tricomas epidérmicos e possivelmente desempenham esta função de absorção hídrica, o que se constitui numa estratégia de aproveitamento do aporte de unidade atmosférica nestes ecossistemas, em especial nas primeiras horas da manhã.

Esclereídes

A presença de esclereídes conectadas aos tricomas nas folhas já foi relatada em espécies da família Euphorbiaceae (Solender 1908; Metcalfe & Chalk 1950; Rudall 1994) e do gênero *Croton*, a exemplo de *C. alchorneicarpus* Croizat (Sá-Haiad 2009), *C. caldensis* Müll. (Sá-Haiad 2009), *C. compressus* Lam. (Sá-Haiad 1987; Louro *et al* 2003), *C. floribundus* Spreng. (Araújo 2007), *C. fuscescens* Spreng. (Metcalfe & Chalk 1950), *C. rhamnifolius* H.B.H. (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro 2006), *C. sonderianus* Müll. Arg. (Nepomuceno & Oliveira 1979) e *C. triqueter* Lam. (Starling 1993). Este complexo tricoma-esclereíde é interpretado como uma estrutura de sustentação e manutenção da arquitetura foliar (Barros & Soares 2013), embora já tenha sido sugerido como uma rota alternativa para a absorção de água (Louro *et al* 2003), hipótese corroborada pelo presente trabalho.

As esclereídes que compõem os apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados em *Croton* não são lignificadas (ou fracamente lignificadas), sendo os espessamentos de suas paredes celulósicos (possuem alta birrefringência em luz polarizada). Este padrão não usual das esclereídes foi também observado em *Androstachys johnsonii* Prain (Alvin 1987), em populações que vivem em ambientes com estresse hídrico, e em *Olea europaea* L. (Azee 1953). *Androstachys* já esteve circunscrito na família Euphorbiaceae (Takhtajan 1980) e atualmente pertence à família Picodendraceae, também da ordem Malpighiales (APG II). Alvin (1987) observou uma conexão entre os tricomas foliares com esclereídes no mesófilo e acredita que estas estruturas estejam diretamente envolvidas no transporte de água nas folhas. O autor sugere a utilização do termo “esclereídes gelatinosas” devido à semelhança estrutural com as fibras gelatinosas, as quais apresentam uma camada G na qual as microfibrilas de celulose são longitudinalmente orientadas e por isso facilitam a absorção de água e podem também armazená-la. A água é transportada até a região do xilema, onde as

esclereídes se comunicam com traqueídes terminais, ou a água pode ser distribuída até as porções epidérmicas pelas esclereídes que atravessam todo o mesofilo, em uma função análoga às extensões de bainha do feixe vascular como ocorre em muitas folhas de xerófitas (Fahn 1986). Nas folhas de *Hakea suaveolens* R. BR. as ramificações externas das esclereídes do mesofilo formam uma hipoderme, enquanto as ramificações internas estão em contato com traqueídes modificadas nas terminações dos feixes vasculares. As terminações externas não se lignificam e a esclereide se mantém viva atuando no transporte de água à epiderme e aos tecidos fotossintetizantes (Heide-Jørgensen 1990).

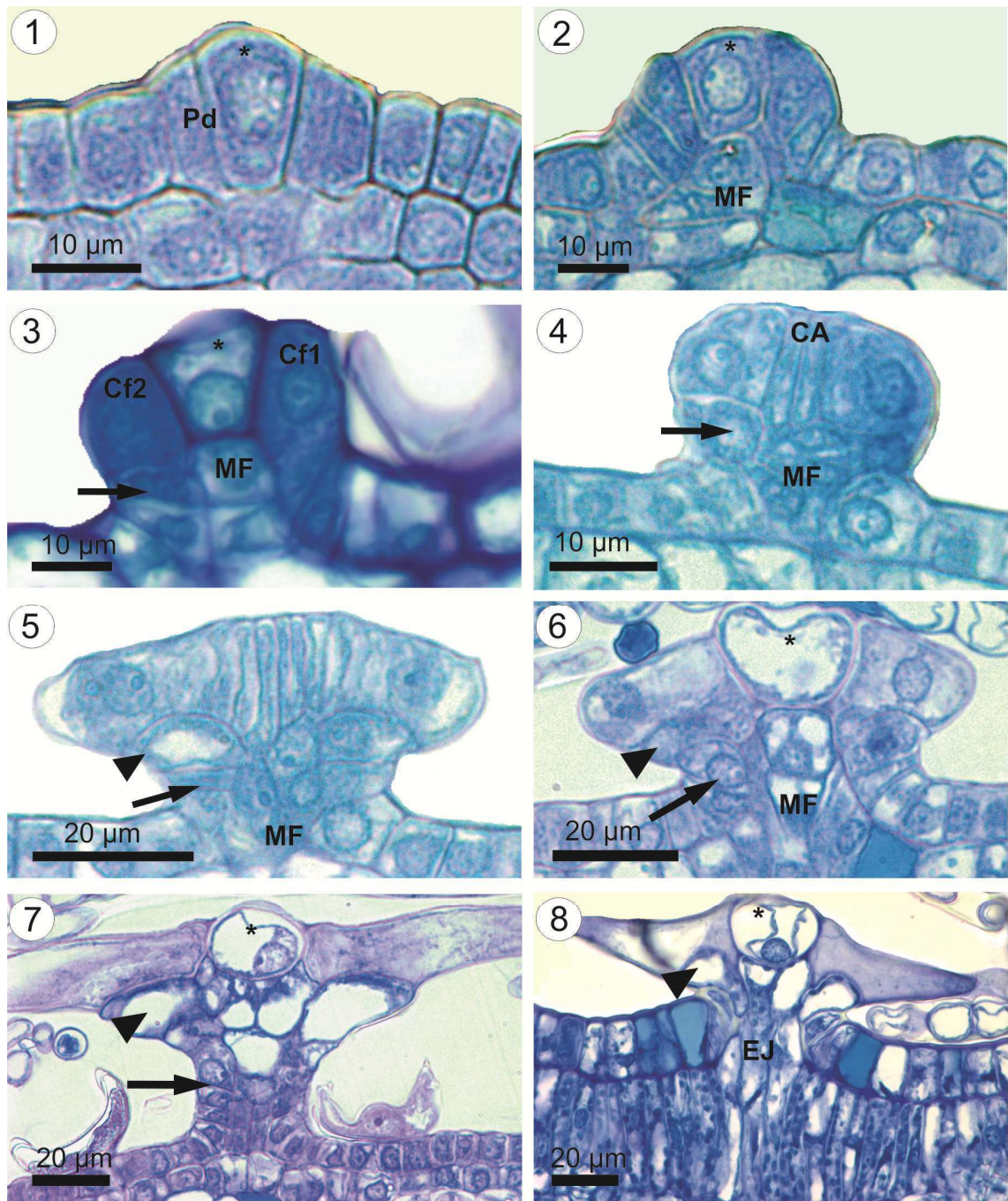
Esclereídes são as células mais polimórficas que podem ser encontradas no corpo vegetal, podendo ocorrer em grupo ou como idioblastos isolados (Evert 2006). A investigação acerca deste tipo celular em angiospermas já foi foco de estudo de muitos pesquisadores, principalmente no que se refere a sua caracterização morfológica e ao seu valor taxonômico (Foster 1956; Rao 1991; Rao & Das 1979), entretanto, o significado funcional destas células não está completamente esclarecido. Tradicionalmente, as esclereídes são classificadas como células do esclerênquima que apresentam parede secundária espessa e lignificada que contribuem com a sustentação do órgão em que ocorrem (Evert 2006). No entanto, um número crescente de trabalhos vem confirmando a participação ativa das esclereídes na distribuição de água em folhas de espécies adaptadas a ambientes com estresse hídrico (Tucker 1964; Fahn 1986; Alvin 1987; Heide-Jørgensen 1990; Milanez & Machado 2008).

Rudall (1994) acredita que as esclereídes em Crotonoideae sejam estruturas homólogas aos laticíferos, devido a semelhança estrutural entre esses dois tipos celulares e sua ocorrência comum associada com feixes vasculares e com células epidérmicas. Segundo Rudall (1994), esclereídes ocorrem no mesofilo de espécies de Euphorbiaceae geralmente (porém não exclusivamente) quando os laticíferos estão ausentes. Nas folhas de *Croton erythroxylodes*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus* ocorrem esclereídes e laticíferos concomitantemente, sendo que ambos os tipos celulares apresentam paredes espessas. Em algumas das esclereídes observadas no mesofilo destas espécies, as células parecem manter um conteúdo intracelular e, nestes casos, assemelham-se à estrutura dos laticíferos. A manutenção de um conteúdo intracelular nas esclereídes de *Croton* pode ser uma importante estratégia para evitar a perda ou refluxo da água absorvida pela estrutura dos apêndices escamiformes, estrelados e fasciculados.

Em seu trabalho, Rudall (1994) observou laticíferos associados com a base dos tricomas, apresentando a mesma distribuição descrita para as esclereídes em *C. erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus*. É possível que espécies de *Croton* que evoluíram em ambientes com restrição hídrica tenham sofrido uma pressão de seleção na qual os laticíferos do mesofilo, associados aos tricomas epidérmicos, tenham se especializado em estruturas celulares com capacidade de translocação de água, tendo, juntamente com os tricomas, um papel fundamental na absorção de água e nutrientes do meio externo.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que os tricomas observados nas folhas de *C. erythroxyloides*, *C. pygmaeus* e *C. splendidus* correspondem a uma estrutura multicelular complexa de origem protodérmica e do meristema fundamental adaptada à absorção e distribuição de água nas folhas. A evolução destas estruturas, denominadas no presente trabalho como apêndices, está relacionada com o padrão de distribuição de *Croton*, sendo responsáveis pelo sucesso adaptativo deste gênero em ambientes onde a água é um fator limitante.



Figs. 1 a 8: Desenvolvimento ontogenético dos apêndices escamiformes acompanhado em secções transversais de folhas de *Croton erythroxylodes* incluídas em resina e coradas com azul de toluidina. **Fig. 1.** Célula protodérmica volumosa e com núcleo evidente marca o início do desenvolvimento do apêndice. **Fig. 2.** Protuberância formada por divisões protodérmicas e início da atividade do meristema fundamental. **Fig. 3.** Aumento da protuberância por atividade protodérmica e do meristema fundamental. **Fig. 4.** Células dos raios iniciam as suas divisões anticliniais. Processo também evidenciado na figura 5. **Fig. 5.** Secção tangencial do apêndice, evidenciando a posição periférica do núcleo nas células do raio e início da diferenciação das células do disco subradial. **Fig. 6.** Célula central inicia o espessamento das paredes anticliniais; células do raio mantêm o alongamento periférico; início da diferenciação das esclereídes. **Figs. 7 e 8.** Etapa final de desenvolvimento do apêndice: célula central viva, com núcleo evidente; raios formados, em processo de espessamento de parede; células do disco subradial ainda em diferenciação; pedúnculo em processo final de formação (Fig. 7) e esclereídes jovens (Fig. 8). **Asterísco.** Indica célula central. **Seta.** Indica células do pedúnculo. **Cabeça de seta.** Indica células do disco subradial. **CA.** Células Adjacentes à célula central. **Cf1.** Célula filha 1 da célula protodérmica inicial central. **Cf2.** Célula filha 2 da célula protodérmica inicial central. **EJ.** Esclereíde Jovem. **MF.** Meristema fundamental. **Pd.** Protoderme.

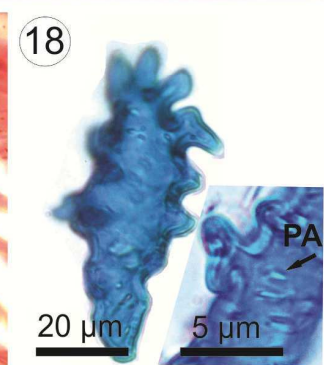
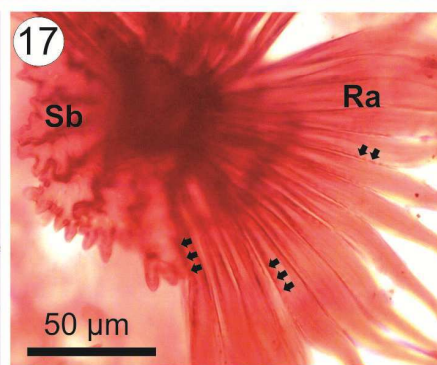
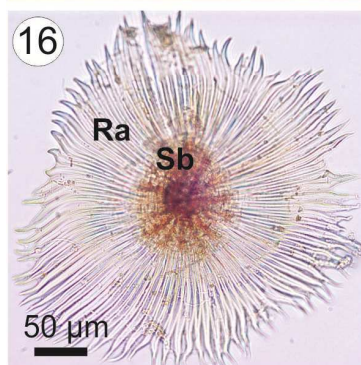
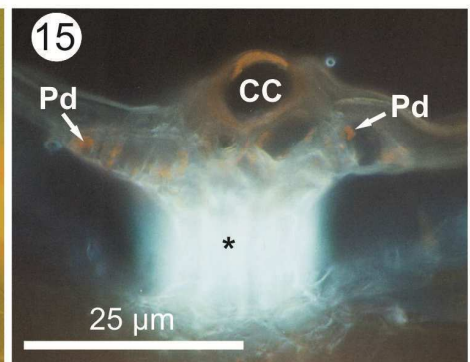
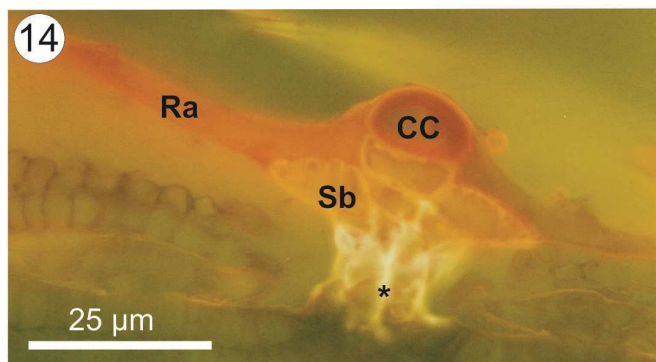
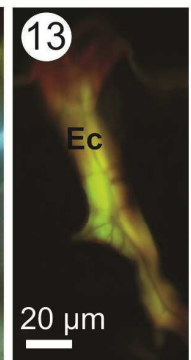
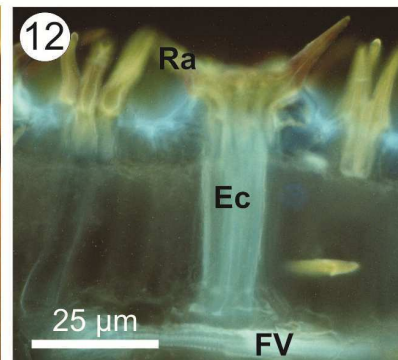
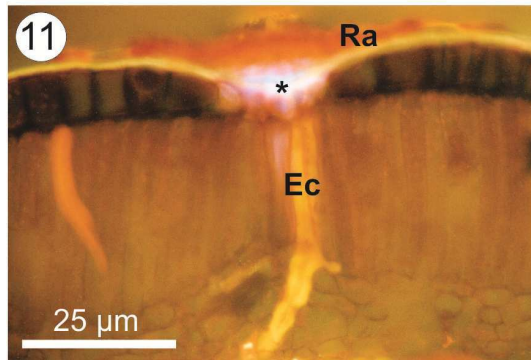
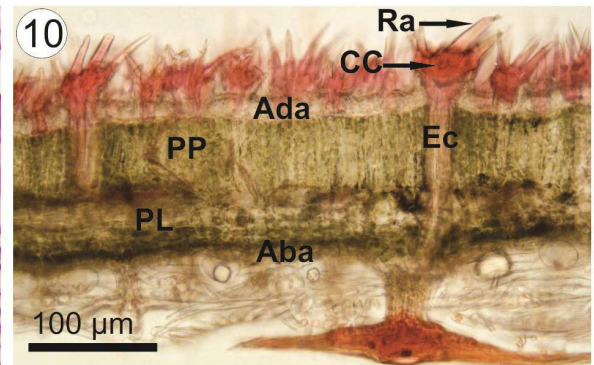
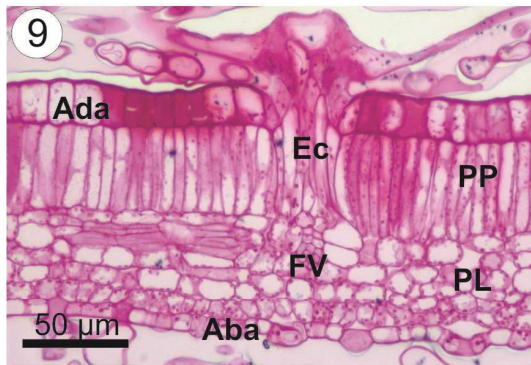
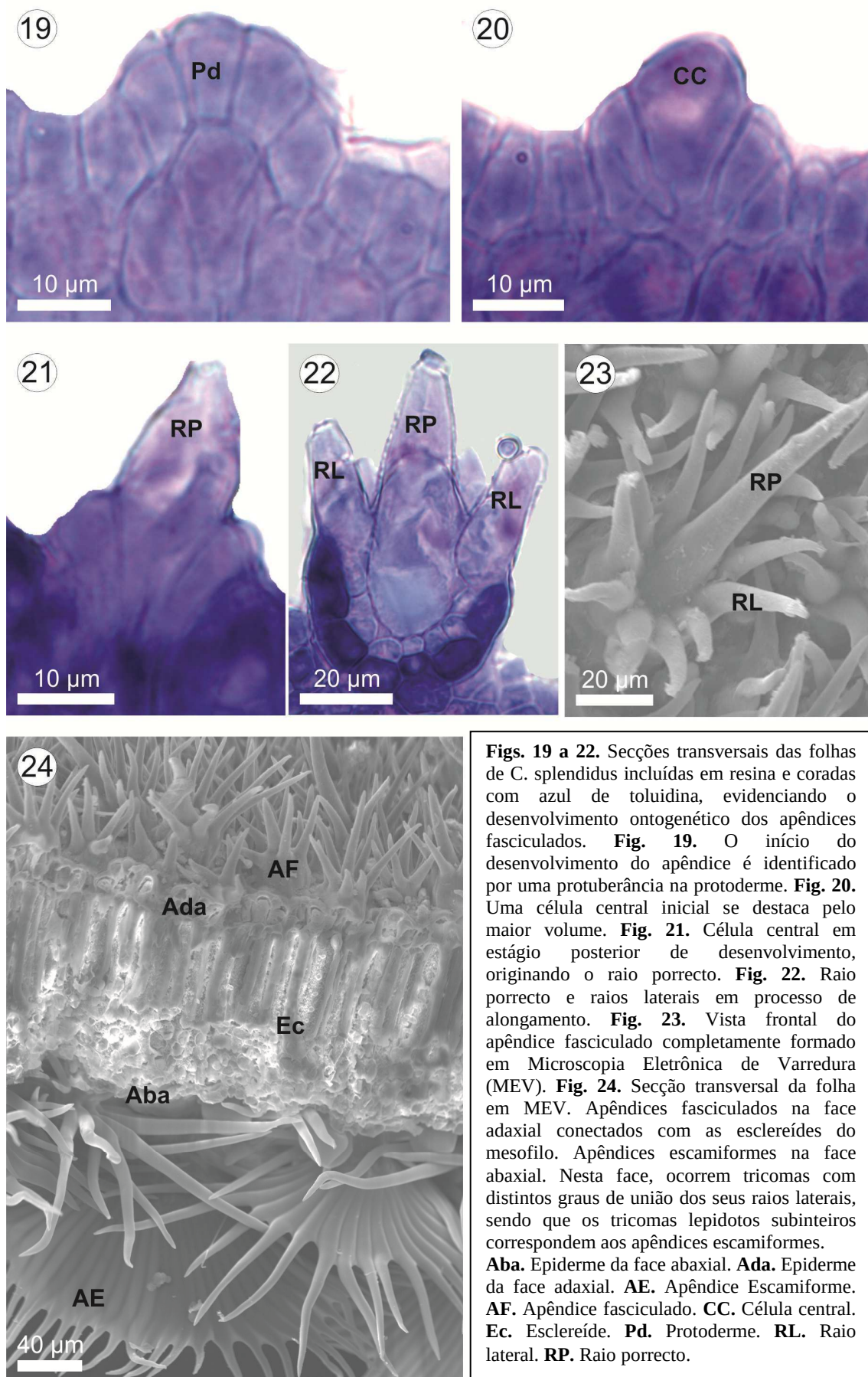


Fig. 9. Folha de *C. erythroxyloides* submetida à reação com PAS, evidenciando esclereídes jovens conectadas diretamente ao feixe vascular. **Fig. 10.** Folha de *C. splendidus* submetida à reação com floroglucina ácida, evidenciando esclereídes atravessando todo o mesofilo. **Figs. 11 a 15.** Folhas de *C. erythroxyloides* (Figs. 11, 14 e 15) e *C. splendidus* (Figs. 12 e 13) submetidas à reação com o vermelho neutro e observadas sob indução de fluorescência. **Fig. 11.** Pedúnculo curto com paredes das células recobertas por substâncias lipídicas; esclereídes penetrando no mesofilo. **Fig. 12.** Apêndice sésil com terminações das esclereídes junto ao feixe vascular. **Fig. 13.** Detalhe de uma esclereíde com paredes espessas e pontoadas. **Figs. 14 e 15.** Vista geral do apêndice escamiforme pedunculado, cujas paredes possuem deposição de substâncias lipídicas. **Fig. 15.** presença de plastídios (pontos avermelhados) nas células do disco subradial. **Figs. 16.** Vista frontal do apêndice escamiforme em sua coloração natural, raios laterais unidos, apenas com as extremidades livres. Células do disco subradial em segundo plano com tonalidade acastanhada. **Fig. 17.** Vista frontal do apêndice escamiforme corado com safranina, evidenciando as pontoações nas paredes laterais das células do raio e as células do disco subradial. **Fig. 18.** Célula isolada do disco subradial com contorno acentuadamente sinuoso. Em detalhe, evidencia-se a presença de pontoações areoladas em suas paredes.

Aba. Epiderme da face abaxial. **Ada.** Epiderme da face adaxial. **CC.** Célula central. **Ec.** Esclereíde. **FV.** Feixe Vascular. **PA.** Pontoações Areoladas. **Pd.** Plastídios. **PL.** Parênquima Lacunoso. **PP.** Parênquima Paliádico. **Ra.** Raio. **Sb.** Células do disco subradial. **Asterísco.** Deposição de substância lipídica na parede das células do pedúnculo. **Setas pequenas.** Pontoações nas paredes laterais das células do raio.



Figs. 19 a 22. Secções transversais das folhas de *C. splendidus* incluídas em resina e coradas com azul de toluidina, evidenciando o desenvolvimento ontogenético dos apêndices fasciculados. **Fig. 19.** O início do desenvolvimento do apêndice é identificado por uma protuberância na protoderme. **Fig. 20.** Uma célula central inicial se destaca pelo maior volume. **Fig. 21.** Célula central em estágio posterior de desenvolvimento, originando o raio porrecto. **Fig. 22.** Raio porrecto e raios laterais em processo de alongamento. **Fig. 23.** Vista frontal do apêndice fasciculado completamente formado em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **Fig. 24.** Secção transversal da folha em MEV. Apêndices fasciculados na face adaxial conectados com as esclereídes do mesofilo. Apêndices escamiformes na face abaxial. Nesta face, ocorrem tricomas com distintos graus de união dos seus raios laterais, sendo que os tricomas lepidotos subinteiros correspondem aos apêndices escamiformes. **Aba.** Epiderme da face abaxial. **Ada.** Epiderme da face adaxial. **AE.** Apêndice Escamiforme. **AF.** Apêndice fasciculado. **CC.** Célula central. **Ec.** Esclereíde. **Pd.** Protoderme. **RL.** Raio lateral. **RP.** Raio porrecto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvin, K.L. 1987. Leaf Anatomy of *Androstachys johnsonii* Prain and its functional significance. **Annals of Botany** **59**: 579-591.
- Appenzato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. 2006. **Anatomia Vegetal**. 2 ed. UFV, Viçosa.
- Araújo RB (2007) **Anatomia foliar de Croton floribundus Spreng. (Euphorbiaceae Jussieu)**. Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho. B.Sc. Monograph.
- Arzee, T. 1953. Morphology and ontogeny of foliar sclereids in *Olea europaea* L. distribution and structure. **American Journal of Botany** **40**: 680-687.
- Baillon, H. 1858. **Étude generale du groupe des Euphorbiacees**. Victor Masson, Paris.
- Baillon, H. 1864. Euphorbiacées Américaines. **Adansonia** **4**:257-377.
- Barros, I.O. & Soares, A.A. 2013. Adaptações anatômicas em folhas de marmeleiro e velame da caatinga brasileira. **Revista Ciência Agronômica** **44** (1): 192-198.
- Benites, V. M., Caiafa, A. N., Mendonça, E. S., Schaefer, C. E. & Ker, J. C. 2003. Solos e Vegetação nos Complexos Rupestres de Altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Floresta e Ambiente** **10**(1): 76-85.
- Benzing, D.H., Henderson, K. Kessel, B. & Sulak, J. 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. **American Journal of Botany** **63**(7): 1009-1014.
- Bozzola, J. J. & Russel, L. D. 1992. **Electron Microscopy**. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Burger, W. & Huft, M. 1995. Flora costaricensis: Euphorbiaceae. **Fieldiana** **36**: 1-169.
- Caiafa, A. N. & Silva, A. F. 2005. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia** **56** (87): 163-173.
- Caiafa, A. N. & Silva, A. F. 2007. Structural analysis of the vegetation on a highland granitic rock outcrop in southeast of Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** **30** (4): 657-664.
- Caruzo, M. B. R.; VanEe, B. W.; Cordeiro, I.; Berry, P. E. & Riina, R. 2011. Molecular phylogenetics and the character evolution in “Sacaca” clade: Novel relationships of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **60**: 193-206.
- Dickson, W.C. 2000. **Integrative Plant Anatomy**. Harcourt Academic Press, New York.
- Eames, A.J. & MacDaniels, L.H. 1947. **An Introduction to Plant Anatomy**. 2 ed. McGraw-Hill Book Company, Inc. USA.

- Evert, R. F. 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. 1986. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. **Annals of Botan** 57: 631-637.
- Foster, A.S. 1956. Plant idioblasts: Remarkable examples of cell specialization. **Protoplasma** 46: 184-193.
- Froembling W. 1896. Anatomisch-systematische Untersuchung von Blatt und Axe der Crotonen und Euphyllantheen. **Botanisches Centralblatt** 65: 129–139.
- Heide-Jørgensen, H.S. 1990. Xeromorphic leaves of *Hakea suaveolens* R. Br. Ontogeny, structure and function of sclereids. **Australian Journal of Botany** 38: 25-43.
- Hamba, Y. T.; Kogami, H. & Terashima, I H. 2002. The effect of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant, Cell and Environment** 25: 1021-1030.
- Jensen, W.A. 1962. **Botanical histochemistry: principles and practice**. WH Freeman, San Francisco.
- Johansen D.A. 1940. **Plant Microtechnique**. McGraw- Hill, New York.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde– glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology** 27: 137 – 138.
- Kirk Jr., P. W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Stain Technology** 45:1-4.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2003. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica Universidade de São Paulo** 21(2):299-344.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. 2008. Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll.Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica** 8: 21-75.
- Louro RP, Ortiz B, Santiago LJM (2003) Leaf ultrastructure of *Croton compressus* Lam. (Euphorbiaceae). **Acta Microscópica** 12(Suppl B): 61–62.
- Meira, R.M.S.A. & Martins, F.M. 2003. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore** 27: 109-112.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1950. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Vol. I. Clarendon Press, Oxford.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. 1983. **Anatomy of the Dicotyledons**. 2nd. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.

- Millanez, C.R.D. & Machado, S.R. Leaf emergences in *Microlepis oleaefolia* (DC.) Triana (Melastomataceae) and their probable function: An anatomical and ultrastructural study. **Micron** **39**(7):884-90.
- Mohl HVon. 1871. Morphologische betrachtung der Blätter von *Sciadopitys*. In: Mohl HVon, Bary A, eds. **Botanische zeitung**. Verlag Von Arthur Felix, Leipzig. 17-32.
- Moreira, A. A.N. & Camelier, C. 1977. Relevô. In: **Geografia do Brasil: Região Sudeste**. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, vol. 3. 50p.
- Müller, J. 1873. *Croton*. Pp. 81-274 In: Martius, C.F.P. von. **Flora brasiliensis**. Vol 11(2). Munich. Vienna & Leipzig.
- Müller, J. 1866. Euphorbiaceae exceto subordo Euphorbieae. In: Prodrômus systematis universalis regni vegetabilis. **A.P. Candolle, ed. 15 (pars.2): 189-1286**.
- Nepomuceno V.A.G., Oliveira M.L.R. 1979. Estudo anatômico de folhas do gênero *Croton* - I. *C. jacobiensis* Baill. e *C. sonderianus*. Müll. Arg. **Brasil Florestal** **39**:37-42.
- O'Brien, T.P. & McCully, M. E. 1981. **The study of plant structure principles and selected methods**. Termarcaphi Pty. Ltda, Melbourne.
- Pearse, A. G. E. 1980 . **Histochemistry theoretical and applied**, vol. 2, 4 ed. Churchill Livingston, Edinburgh, UK.
- Pridgeon, A.M. 1981. Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany** **68** (1): 64-71.
- Rao & Das 1979. Leaf sclereids – Ocorrence and distribution in the Angiosperms. **Botanic Notiser** **132**: 319-324.
- Rao, T.A. 1991. **Compendium of foliar sclereids in Angiosperms: Morphology and taxonomy**. Wiley, New Delhi.
- Riina, R. 2006. **Molecular Systematics of the Neotropical Dragon's Blood trees *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae)**. Doctoral dissertation. University Of Wisconsin, Madison. Pp. 106.
- Riina, R.; Berry, P.E. & VanEe, B.W. 2009. Molecular phylogenetics of the Dragon's Blood *Croton* sect. *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): a polyphyletic assemblage unraveled. **Systematic Botany** **34**(2): 360-374.
- Riina, R.;& Berry, P.E. 2010. Two new South American species of *Croton* (Euphorbiaceae) and their phylogenetic affinities. **Anales del Jardín Botánico de Madrid** **67**(1): 23-27.
- Rudall, P. 1994. Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution. **Annals of the Missouri Botanical Garden** **81** (2): 270-282.

- Safford, H.D. 1999. Brazilian Páramos II. Macro- and mesoclimate of the *campos de altitude* and affinities with high mountain climates of the tropical Andes and Costa Rica. **Journal of Biogeography** **26**: 713-737.
- Sá-Haiad, B.; Serpa-Ribeiro, A.C.C.; Barbosa, N.C.; Pizzini, D.; Leal, D. de O.; Senna Vale, L. & Santiago-Fernandes, L.D.R. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). **Plant Systematic and Evolution** **283**: 179-202.
- Safford, H. D. & Martinelli, G. 2000. Southeast Brazil. In: **Inselbergs: Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions**. Springer Verlag, Berlin.
- Silveira, M. 1989. Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. In: Souza, W. (ed.) **Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. Técnicas básicas**. Vol. I. Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Rio de Janeiro. Pp.71-90.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. 1942. Anatomy of the inferior ovary of *Darbya*. **American Journal of Botany** **29**: 464-471.
- Solereder H. 1908. **Systematic Anatomy of the Dicotyledons**. Vol. II. Clarendon Press, Oxford.
- Starling MFV (1993) Aspectos taxonômicos do *Julocroton triqueter* (Baill.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) do Campus da UFES, Vitória/ES. **BIOS, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-MG** **1(1)**:7-13
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. 4 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takhtajan, A.L. 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). **Botanical Review** **46**: 225-359.
- Tomlinson, P.B. 1969. Anatomy of the Monocothyledons: III. Commelinales-Zingiberales. Oxford University Press, London.
- Tucker, S.C. 1964. The terminal idioblast in Magnoleaceous leaves. **American Journal of Botany** **51(10)**: 1051-1062.
- Van Ee, B.W. & Berry, P.E. 2011. *Croton* Section *Pedicellati* (Euphorbiaceae), a Novel New World Group, and a New Subsectional Classification of *Croton* Section *Lamprocroton*. **Systematic Botany** **36(1)**: 88-98.
- Webster, G.L. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **42**: 793-823.
- Webster, G. L.; Del-Arco Aguilar, M.J. & Smith, B.A. 1996. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **121**: 41-57.

CONCLUSÃO GERAL

Este é o primeiro trabalho de anatomia em um contexto filogenético em *Croton* e os resultados desta tese apontam para o grande potencial de estudos que integrem caracteres moleculares e anatômicos na resolução de problemas filogenéticos. As limitações da amostragem utilizada, tanto com relação ao número de marcadores moleculares quanto ao número de espécies estudadas, não permitem conhecer as reais interações dentro de *Croton*, dado o grande número de espécies compreendidas neste gênero, porém esclarecem as afinidades filogenéticas entre espécies quando trabalha-se em um universo mais restrito, como foi o caso das seções *Cleodora* e *Lamprocroton*. Dentro de cada uma destas seções, foi possível elucidar a interrelação de suas espécies e aspectos evolutivos, os quais esclarecem sobre a história evolutiva do gênero *Croton* como um todo, especialmente no que se refere à reconstrução dos estados de caráter ancestrais das estruturas secretoras. Verificou-se que a presença de laticíferos articulados é uma simplesiomorfia em *Croton* e que coléteres foliares foram constituem um caráter plesiomórfico em *Croton* e parecem ser diagnósticos para o gênero. Mostrou-se que os idioblastos e os tricomas secretores são estruturas homólogas e que os tricomas secretores são os caracteres apomórficos compartilhados por poucos clados de *Croton*, como é o caso da seção *Lamprocroton*. A presença de nectários extraflorais (NEF's) baselaminares/acropeciolaes é um estado ancestral em *Croton* e identificou-se uma correlação entre o comprimento do pedúnculo dos NEF's e a morfologia da superfície secretora dos mesmos.

Este trabalho marca o início de estudos dos caracteres anatômicos em *Croton* aliados à filogenia molecular. A partir deste estudo inicial, novas investigações poderão ser conduzidas considerando um maior número de espécies e seções de *Croton* juntamente com outros marcadores moleculares contribuindo com um maior esclarecimento acerca das interações dentro do gênero e da história evolutiva de suas espécies relacionando-as com a sua ampla distribuição nos ambientes tropicais.