MUNTOREANU

ÇÃO E
 ATÔMI
 RUTAC

SÃO PAULO, 2008

THAIS GOMES MUNTOREANU

DESCRIÇÃO E MAPEAMENTO DE CARACTERES MORFO-
ANATÔMICOS FOLIARES EM *Pilocarpus* VAHL
(RUTACEAE) E GÊNEROS RELACIONADOS

SÃO PAULO, 2008

THAIS GOMES MUNTOREANU

DESCRIÇÃO E MAPEAMENTO DE CARACTERES MORFO-
ANATÔMICOS FOLIARES EM *Pilocarpus* VAHL
(RUTACEAE) E GÊNEROS RELACIONADOS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na área de Botânica.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Gladys Flávia A.
Melo de Pinna

SÃO PAULO, 2008

Muntoreanu, T. G.

Descrição e Mapeamento de caracteres morfo-anatômicos
Foliares em *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) e
gêneros relacionados. 98P.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo, Departamento de Botânica

1. Rutaceae neotropicais 2. anatomia foliar 3. venação 4. mapeamento

Comissão Julgadora

Prof (a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Gladys Flávia A. Melo de Pinna

"A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência".

EU DEDICO

Aos meus queridos pais,

**A força e o amor me dirigiram pela vida e me
deram as asas que precisava para voar.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo – USP, ao Instituto de Biociências, ao Departamento de Botânica e em especial, ao Laboratório de Anatomia Vegetal pela a oportunidade de desenvolver esta dissertação e contribuir com meu desenvolvimento profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP, pelo auxílio financeiro dado à esse trabalho.

Aos meus queridos pais, Reynaldo e Genuina, e aos meus irmãos, Thiago e Thainá, que sempre me amaram e me apoiaram em todas as decisões da minha vida. Agora a família cresceu, Jussara (minha cunhadinha) e Julinha (a coisa mais linda da titia). Amo vocês!

À minha querida orientadora e amiga, Flávia – desde minha época de Iniciação no Piauí, eu nem a conhecia ainda, mas já a admirava quando lia seus trabalhos. Acho que foi coisa do destino, eu queria voltar pra SP, fazer mestrado, e quando procurei o nome dos professores do laboratório de anatomia, vi o seu nome no site da USP... A partir desse dia, minha vida mudou... Muito obrigada pela oportunidade, por contribuir com o meu amadurecimento profissional, pelas noites de sushi e de vinhos na sua casa. Você e a Julinha moram no meu coração!!!

Ao Pedro Dias, pela elaboração do projeto, por ter me ajudado muito na época da qualificação e por ter coletado todo material.

Aos professores do Laboratório de Anatomia Vegetal: Verônica, Gregório, Maria Emília, e Dra. Berta, pelas discussões científicas realizadas nas nossas reuniões do laboratório e pelo agradável convívio diário. E um agradecimento especial à Nanuza, pela maravilhosa viagem à Serra do Cipó, pelo passeio em Embu das artes e principalmente por transmitir o amor que tem pela botânica, sou sua fã!!!

À minha querida “irmãzinha” pernambucana-paulista, essa baixinha é arretada, Emília, por todos momentos compartilhados, nesses quase 3 anos, muitas conversas, festinhas, piadas.. Admiro muito a sua força e sempre estarei por perto quando precisar... Que o mundo nos aguarde!!! Também não posso deixar de agradecer minha outra irmãzinha “peruana-brasileira”, “miss mercosul”, Karin, por toda sua amizade, pelas aulas de espanhol e pelo carinho que sempre teve comigo... A amizade de vocês é eterna para mim!!!

Aos meus queridos amigos da pensão e da casa da laje, em especial, Guilherme, Mathieu, Bruno, Jonathas, John, Hildebrando, Edjane, Helena, e às minhas queridas amigas da “tripla-

jornada" (laboratório e casa), Deusita, Celina, Vanessa e Bianca. Muito obrigada a todos vocês por tornar a nossa república à extensão da casa dos nossos pais.

À Gi, técnica e amiga, pela paciência que teve em me ensinar algumas técnicas em anatomia e pelas divertidas conversas na copa.

Minhas amadas amigas, do grupo da tia Nan, Crisoca e Paulete, por todos os nossos intervalos, conselhos, festinhas, viagens, sinucas, conversas filosóficas sobre a vida, etc... Vocês deixam o dia a dia do laboratório mais divertido.

Aos queridos Marcelo, meu companheiro de sushi, e Mariane, pelas valiosas dicas sobre a dissertação... Muito obrigada!!

Aos meus queridos colegas e amigos da pós-graduação ou iniciação, Vivi Jono, Giu, Marlene, Guilherme, Natália, Renatinha, Zé, Andrezão, Cris (da Flávia), Ari, Bruno, Pigozzo, João Carlos, Luís, Poli, Carla, Karen..... pelo o dia a dia do laboratório, pelas festinhas na "laje"...

Às queridas colegas e amigas que já concluíram seus estudos na pós-graduação Vera, Marli, Marina Cattai, Marina Milanelo, Luciana, Adriana e Érica, pelo dia a dia do laboratório e pelas as conversas informais na copa e na sala de pós.

Ao meu querido amigo do "IPT", Sr. Antônio, pelo sincero e carinhoso laço de amizade.

Aos amigos da sistemática, Euder, Juliana e Cíntia, pela deliciosa companhia na viagem à serra do Cipó.

À todos os funcionários da secretaria, Carlos, Noberto e Cesário, ao pessoal da limpeza, em especial à Susi.

Aos meus familiares do Piauí, em especial, à minha vizinha Bella, e aos meus amigos de I tu....

Enfim, à todos vocês... de coração.... Muito obrigada!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ÍNDICE

	Página
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Material Botânico	15
3.2. Metodologia	17
3.2.1. Análise morfo-anatômica	17
3.2.2. Mapeamento dos caracteres anatômicos	19
4. RESULTADOS	
4.1. Anatomia da lâmina foliar	19
4.2. Venação	24
4.3. Anatomia do pecíolo	26
4.4. Mapeamento dos caracteres	29
5. DISCUSSÃO	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8. FIGURAS	52

RESUMO

A maioria dos estudos filogenéticos envolvendo Rutaceae foi baseada em dados macromoleculares e poucos utilizaram gêneros neotropicais. Uma exceção a esses trabalhos, foi a análise filogenética de *Pilocarpus*, um gênero de Rutaceae neotropical, baseada em caracteres morfológicos proposta por Dias e colaboradores. Considerando a importância dos estudos anatômicos em análises cladísticas, os quais podem constituir uma importante fonte de informações para a própria definição de estados de caráter e conseqüente proposição de homologia primária dos caracteres, o presente estudo teve como objetivo investigar e mapear caracteres foliares para *Pilocarpus* e gêneros relacionados com base na anatomia vegetal. Para tanto, analisou-se a organização estrutural foliar de 12 espécies, empregando-se as técnicas usuais em anatomia vegetal à dissociação de epidermes, secções transversais e longitudinais, e diafanização, adotando-se as microscopias de luz e eletrônica de varredura. Foram descritos 32 caracteres morfo-anatômicos foliares, dentre estes podem ser citados: ornamentação da cutícula; tipos de tricomas, estômatos, estruturas secretoras, cristais e células do periciclo; características do mesofilo e da venação. Com o mapeamento destes caracteres, baseado na filogenia proposta por Dias e colaboradores, foi possível observar a tendência de alguns caracteres serem informativos para determinados terminais, ou até mesmo para o grupo *Pilocarpus*, propondo suas possíveis relações filogenéticas. Diante disso, observou-se a tendência de que grande parte destes caracteres sejam homoplásticos, 8 dos 32 caracteres sejam autapomórficos. Apenas os estados referente a drusas de oxalato de cálcio no parênquima paliádico e drusas de oxalato de cálcio no pecíolo, possivelmente, representem uma sinapomorfia para *Pilocarpus*. Além disso, as árvores mapeadas foram agrupadas de acordo com o número de caracteres que alguns terminais apresentaram em comum. Por exemplo, *Raulinoa echinata* e *Helietta apiculata* foram os terminais que apresentaram um maior número de caracteres em comum. No entanto, não foi possível afirmar quais são os caracteres filogeneticamente informativos, sendo necessário a inclusão dos dados anatômicos à matriz de caracteres morfológicos proposta por Dias e colaboradores, a fim de que novas informações sejam geradas e/ou comprovadas.

ABSTRACT

Most of the phylogenetics studies involving Rutaceae were based on macromolecular data and few used neotropicais generas. An exception of these works, was the phylogenetic analysis about *Pilocarpus*, a genus of neotropical Rutaceae, based on morphological characters proposed for Dias and collaborators. Considering the importance of the anatomical studies in cladistics, which can constitute an important source of informations for itself definition about states of character and consequent proposition of primary homology of the characters, the goals of the present study were to investigate and mapping leaves' characters for *Pilocarpus* and related genera based on the vegetative anatomy. For these studies, the structural leaf organization of 12 species were analysed, using the usual techniques in vegetative anatomy to the dissociation of epidermis, cross and longitudinal sections and diafanization, adopting the Optical microscopy and scanning electron microscopy. Thirty two morfo-anatomical leaves characters were described: ornamentation of the cuticle; kind of trichomes, stomata, secretory structures, crystals and cells of the pericycle; characteristics of the mesophyll and venation. With the mapping of these characters, based on the phylogenetic proposed by Dias and collaborators, was possible to observe the tendency of some characters to be informative for determined taxons, or even for the group *Pilocarpus*, proposing its possible relations Phylogenetic. With this, was observed the tendency of what great part of these characters be homoplastics, 8 of 32 characters are autapomorphic. Druse calcium oxalate in the palisade parenchyma and in the petiole, possibly, represent a synapomorphic traits for *Pilocarpus*. Beside this, the mapped trees were grouped in accordance with the number of characters that some taxons presented in common. For example, *Raulinoa echinata* and *Helietta apiculata* were the species that presented the biggest number of characters in common. However, it was not possible to affirm what the characters are phylogenetic informative, being necessary the inclusion of the anatomical data to the matrix of morphological characters proposed by Dias and collaborators, so that new informations are produced and / or proved.

1. INTRODUÇÃO

A família Rutaceae inclui cerca de 150 gêneros e 1500 espécies, com ampla distribuição nas regiões tropicais e temperadas do mundo todo, sendo abundante na Austrália e sul da África (Cronquist 1988). No Brasil, são 32 gêneros nativos de Rutaceae com 154 espécies (Pirani 1999). Os representantes da família apresentam hábito muito variado, desde árvores, arbustos até ervas, sendo rara esta última condição (Cronquist 1981).

Segundo Pirani (1999), o posicionamento de Rutaceae nos sistemas modernos de classificação é colocado em Rurales *senso stricto* (Takhtajan 1980, 1996; Dahlgren 1980) ou em Sapindales *senso lato* (Cronquist 1981, 1988; Thorne 1992). O mesmo autor ainda menciona que recentes análises filogenéticas baseadas em dados macromoleculares (DNA), feita por Gadek *et al.* (1996), vieram confirmar a provável monofilia da família Rutaceae e sua inclusão na igualmente monofilética ordem Sapindales.

Adicionalmente, a monofilia da ordem Sapindales é indicada pelas sinapomorfias de folhas compostas pinadas (ocasionalmente podem ser compostas palmadas, trifolioladas ou unifolioladas) e flores com um disco nectarífero bem desenvolvido (Judd *et al.* 2002). Cronquist (1981) adiciona outras características para os membros de Sapindales, como: androceu haplostêmone ou diplostêmone e ovário sincárpico com um número limitado de óvulos em cada lóculo, geralmente 1 ou 2.

Judd *et al.* (2002) menciona que Sapindales é composta por 9 famílias e cerca de 5800 espécies, sendo as famílias mais representativas: Anacardiaceae, Burseraceae, Meliaceae, Rutaceae, Sapindaceae e Simaroubaceae. Trabalhos de Gadek *et al.* (1996) e Soltis *et al.* (2000), baseados na sequência do DNA, mostram que Meliaceae + Rutaceae + Simaroubaceae formam um clado. O principal caráter que separa Rutaceae das outras famílias é a presença de pontuações translúcidas nas folhas, que correspondem a cavidades glandulares multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos (Metcalf & Chalk 1950; Heywood 1993; Judd *et al.* 2002).

De acordo com a revisão feita por Scholz (1964) baseada em trabalhos anteriores feitos por Engler (1874, 1896 e 1931), a família Rutaceae está dividida em 7 subfamílias:

- 1. Subfamília Rutoideae.** Trata-se da maior subfamília. Compreende cerca de 86 gêneros distribuídos em 5 tribos (Zanthoxyleae, Ruteae, Boronieae, Diosmeae e Galipeae), sendo bem representado no Brasil os gêneros: *Zanthoxylum*,

Pilocarpus, *Esenbeckia*, *Metrodorea*, *Galipea*, *Raputia*, *Neoraputia*, *Conchocarpus* e *Spiranthera*.

2. **Subfamília Dictyolomatoideae.** Sufamília monogenérica (*Dictyoloma*), representada por 2 espécies no Brasil e no Peru.
3. **Subfamília Flindersioideae.** Constituído por 2 gêneros, *Chloroxylon* e *Flindersia*, não representados na América.
4. **Subfamília Spathelioideae.** Atualmente, após estudo de Cowan & Brizicky (1960), possui um único gênero (*Spathelia*), possuindo representantes no Brasil.
5. **Subfamília Toddalioideae.** Contém uma só tribo com 5 subtribos e cerca de 24 gêneros, representada no Brasil por *Helietta*, *Balfourodendron* e *Hortia*.
6. **Subfamília Citroideae (= Aurantioideae).** Compreende 1 tribo (Aurantieae) com 30 gêneros sem representantes nativos no Brasil. O representante mais conhecido é *Citrus*.
7. **Subfamília Rhabdodendroideae.** Esta última subfamília foi definitivamente excluída de Rutaceae por autores como Prance (1972), Takhjan (1980) e Cronquist (1981), sendo elevado à categoria de família (Rhabdodendraceae), constituído pelo gênero *Rhabdodendron*, com 2 espécies na Amazônia brasileira.

Diversos representantes da família Rutaceae são utilizados comercialmente. Sem dúvida, o gênero *Citrus* é o mais conhecido de toda a família, sendo cultivado no mundo todo, com espécies e híbridos produzindo frutos comestíveis como: laranja, limão, lima, tangerina entre outras (Heywood 1993). Algumas espécies também são ornamentais, como: *Ravenia spectabilis*, *Murraya paniculata*. Segundo Pirani (1999a), algumas espécies fornecem madeiras com boas propriedades técnicas, mas em geral não tem grande importância comercial e são de uso local, citando-se: as tamanqueiras (*Zanthoxylum* spp.), as arapocas (*Raputia* e *Neoraputia* spp. E *Galipea* spp.), o guarantã (*Esenbeckia leiocarpa*) e o pau-marfim (*Balfourodendron riedelianum*).

Na medicina, *Pilocarpus* (“jaborandis”, subtribo Pilocarpinae) é um dos gêneros mais importantes economicamente dentre as Rutaceae neotropicais, conhecido na indústria farmacêutica por produzir pilocarpina em seu metabolismo secundário, sendo utilizada no tratamento do glaucoma.

Alguns trabalhos de revisão taxonômica de Pilocarpinae foram desenvolvidos como o de Kaastra (1982), Skorupa (1996) para *Pilocarpus*, e Pirani (1998) para *Balfourodendron* Mello ex Olliver e *Helietta* Tul. (subtribo Pteleinae)

Atualmente, são reconhecidas 17 espécies de *Pilocarpus*, distribuídas do sul do México ao Brasil e Argentina. O Brasil abriga 13 espécies, sendo que 11 delas ocorrem exclusivamente no território brasileiro (Skorupa 1996). Seus representantes ocorrem em várias formações vegetacionais, tais como florestas estacionais, cerrados, caatingas e restingas e diferem dos outros gêneros (*Esenbeckia* Kunth, *Metrodorea* A. St.-Hil. e *Raulinoa* Cowan) da mesma subtribo, todos exclusivamente neotropicais, por apresentarem racemos e anteras com glândulas dorsais.

Dentre os trabalhos de filogenia publicados até o momento para Rutaceae, *Pilocarpus* encontra-se representado por apenas uma espécie nos trabalhos de Chase *et al.* (1999) e Groppo Jr. (2004), sendo que ambos utilizaram dados macromoleculares. Na árvore apresentada por Chase *et al.* (loc. cit.), *Pilocarpus* emerge como irmão de *Choisya* (gênero do velho mundo), o que é resultante da não inclusão de outros gêneros neotropicais. Já na análise feita por Groppo Jr. (loc. cit.), apesar de serem incluídos vários gêneros de Rutaceae neotropicais, a árvore apresentou uma politomia para os grupos neotropicais, a qual deve ser mais explorada.

Entretanto, Dias e colaboradores (submetido) apresentaram uma análise filogenética para *Pilocarpus*, sendo a primeira para um gênero neotropical em Rutaceae. Adicionalmente, é a primeira análise filogenética para a família a usar apenas caracteres morfológicos e elaborada sob abordagem bayesiana. Neste trabalho, o monofiletismo para *Pilocarpus* foi fortemente sustentado, e o uso de dados morfológicos mostrou-se como uma importante fonte de informação filogenética.

Não obstante, esse e os outros estudos têm negligenciado de um modo geral os dados anatômicos, os quais podem constituir uma importante fonte de informações para a própria definição de estados de caráter e conseqüente proposição de homologia primária dos caracteres (Dias *et al.* submetido).

Até o momento, existem poucos trabalhos publicados sobre a anatomia foliar de representantes de Rutaceae. Dentre esses trabalhos, destaca-se o de Liu & Hu (1998), no qual foram estudadas a estrutura e a ontogênese das cavidades secretoras de 22 gêneros, 40 espécies e 2 variedades de Rutaceae da China; os autores, então, discutem seus dados à luz das possíveis relações entre as subfamílias e entre os gêneros de Rutaceae. Adicionalmente, Ogundipe (2002) também se destaca por apresentar caracteres anatômicos úteis na delimitação infragênica de *Zanthoxylum* L., tais como a organização do mesofilo, a distribuição dos estômatos e os padrões de venação.

Considerando apenas *Pilocarpus*, os estudos anatômicos mais recentes restringem-se ao de Marquete (1981), no qual foram estudadas as estruturas do pecíolo, lâmina e nervuras de *P. organensis* Occhioni & Rizzini (= *P. pauciflorus* A. St.-Hil.); o de Gallardo & Jiménez (2002), no qual foi analisada a anatomia foliar de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (= *P. racemosus* Vahl) onde foram descritas características xeromórficas; e de Spegazzini e colaboradores (2002), no qual foi feita uma micrografia foliar quali-quantitativa de três espécies de *Pilocarpus*, a fim de encontrar caracteres diagnósticos aos referidos táxons. Como pode ser notado, entretanto, nenhum dos trabalhos citados não foram executados sob o paradigma filogenético.

Segundo Judd (2002), os caracteres morfológicos são usados para hipotetizar relações filogenéticas, podendo ser encontrados em todas as partes das plantas, vegetativas e reprodutivas. Carlquist (1961 *apud* Dickison 2000) menciona que as folhas são órgãos anatomicamente variáveis, e que esta variação é, às vezes, específica para gêneros, espécies ou mesmo família. Dickison (1975), em seu trabalho sobre as bases da filogenia em angiospermas, menciona que numerosos caracteres anatômicos dentro das folhas tem tido um valor sistemático em diferentes linhagens, citando como exemplo características da cutícula e da epiderme; tipos de tricomas e estômatos; características do mesofilo (tipos, formas das células, números de camadas); presença de estruturas secretoras e cristais; padrão de venação e arranjo do sistema vascular na folha e no pecíolo.

Para Rutaceae, até o momento, não há nenhum trabalho publicado que tenha utilizado dados anatômicos em análises cladísticas. No entanto, pode-se citar alguns trabalhos com outras famílias de angiospermas que utilizaram caracteres anatômicos foliares na filogenia (ex. Aliscioni 2002; Landrum 2002; Mello-Silva 2005).

Considerando a importância dos estudos anatômicos em análises cladísticas, insere-se a presente proposta de investigação e mapeamento de caracteres foliares para *Pilocarpus* e gêneros relacionados com base na anatomia vegetal. Esta proposta constitui o primeiro esforço para a delimitação anatomicamente embasada de estados de caracteres em gêneros de Rutaceae neotropicais.

2. OBJETIVOS

O presente estudo objetiva elucidar aspectos morfo-anatômicos foliares para *Pilocarpus* (Rutaceae) e gêneros relacionados a fim de:

1-) Contribuir com o conhecimento anatômico de alguns gêneros de Rutaceae neotropicais, pouco descrito na literatura;

2-) Levantar e analisar os caracteres morfo-anatômicos ocorrentes no grupo, além de relacioná-los com o ambiente em que vivem;

3-) Mapear tais caracteres, baseado na filogenia proposta por Dias e colaboradores, a fim de identificar possíveis caracteres informativos, para que no futuro, estes possam ser utilizados em estudos filogenéticos do grupo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

Dos vinte e três terminais propostos na filogenia por Dias *et al.* (submetido) foram estudados doze, sendo seis representantes de *Pilocarpus* e seis de gêneros relacionados (Figs. 1-7). A lista de espécies, com os respectivos vouchers, localidades e tipo de vegetação, encontra-se na tabela 1.

Parte dos ramos coletados foi fixado em FAA 50 – formaldeído, ácido acético e etanol 50% – (Johansen 1940) e estocado em etanol 70%, e a outra parte, encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF).

Tabela 1: Lista das espécies estudadas, suas respectivas localidades, vegetação e vouchers.

SUBFAMÍLIA/ TRIBO/ SUBTRIBO	ESPÉCIES	VOUCHER	LOCALIDADE CIDADE – ESTADO	VEGETAÇÃO
Rutoidea/ Galipea/ Cuspariinae	<i>Galipea trifoliata</i> Aubl.	P. Dias 230 P. Dias 231	Presidente Médice - RO Ouro Preto D'Oeste - RO	Floresta ombrófila densa
	<i>Pilocarpus alatus</i> Joseph ex Skorupa	P. Dias 247 P. Dias 252	Buritcupu - MA	Floresta ombrófila densa
	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes	P. Dias 253 P. Dias 254 P. Dias 235	Viçosa do Ceará - CE	Brejo de altitude
Rutoidea/ Galipea/ Pilocarpinae	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardl.	P. Dias 237 P. Dias 238	Parauapebas - PA	“Canga” (vegetação savânica sobre minas de minério)
	<i>Pilocarpus pauciflorus</i> A. St.-Hil.	P. Dias 218	Piracicaba - SP	Mata mesófila semi-decídua
	<i>Pilocarpus giganteus</i> Engler	P. Dias 337 P. Dias 206	Linhares – ES	"Mussununga" (veg. savânica arbustivo-arbórea)
	<i>Pilocarpus spicatus</i> A. St.-Hil.	P. Dias 325 P. Dias 257	Caetité – BA	Mata de galeria
	<i>Raulinoa echinata</i> Cowan	P. Dias 258 P. Dias 259	Apiúna - SC	Mata ciliar
	<i>Esenbeckia leiocarpa</i> Engler	P. Dias 214	Piracicaba - SP	Cultivado
	<i>Metrodorea flavida</i> K. Krause	P. Dias 229	Alvorada D'Oeste - RO	Floresta ombrófila densa
Toddalioideae/ Toddalieae/ Pteleinae	<i>Balfourodendron riedelianum</i> Engler	P. Dias 217 P. Dias 345 P. Dias 216	Piracicaba – SP	Cultivado
	<i>Helietta apiculata</i> Benth	P. Dias 344	Piracicaba – SP	Cultivado

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. Análise morfo-anatômica

Para o presente estudo foram analisadas as regiões da lâmina foliar e do pecíolo. No primeiro caso, foram feitos cortes transversais e longitudinais da região mediana da folha ou folíolo totalmente expandido. Para o estudo anatômico do pecíolo, utilizou-se inicialmente a região basal. Mas em algumas espécies analisadas surgiu uma dúvida em relação ao estado de caráter do sistema vascular, sendo necessário seccionar o pecíolo até a região mediana, para que esta dúvida pudesse ser solucionada.

Para estas secções histológicas, foram aplicadas tanto as técnicas de cortes à mão como a de inclusão em parafina (Johansen 1940).

Nos cortes à mão, os segmentos transversais e longitudinais foram clareados em água sanitária a 50%, corados com safranina 1% em etanol 50% e azul de astra 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972) e montados em lâminas semi-permanentes com glicerina a 50% (Purvis *et al.* 1964).

Para os cortes incluídos na parafina, o material em etanol 70% foi colocado no dessecador durante dois dias para a retirada de ar. Após a retirada de ar, a infiltração seguiu o seguinte protocolo: desidratatação em série etanol/álcool butílico terciário (50-100%), deixando o material por duas horas em cada série; *overnight* em butanol P.A. (puro); início da infiltração em série butanol P.A./parafina (3:1; 1:1; 1:3), com trocas a cada duas horas; parafina pura por quatro horas; material emblocado em caixinhas de papel.

Após o emblocamento, o material foi seccionado em micrótomo rotativo em séries transversais e longitudinais, na espessura média de 10-12 µm, sendo distendido e aderido em lâminas histológicas. Posteriormente, estas lâminas foram desparafinadas em acetato de butila a 60°C por duas horas, e coradas com safranina 1% em etanol 50% e azul de astra 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972). Lâminas permanentes foram montadas utilizando resina sintética “Entellan”.

Para determinar o tipo de estômato, utilizou-se a técnica de dissociação da epiderme com peróxido de hidrogênio e ácido acético 1:1 (Franklin 1945) e sua descrição baseou-se nos critérios propostos por Radford *et al.* (1974).

Para a observação da ornamentação cuticular e detalhes dos tricomas e estômatos, utilizou-se à microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os segmentos da lâmina foliar

foram desidratados em série etanólica e submetidos a ponto crítico. Posteriormente, foram aderidos a suportes metálicos e cobertos com ouro, conforme o procedimento usual no MEV descrito por Silveira (1989).

Os padrões da vascularização foliar foram determinados a partir de lâminas foliares diafanizadas empregando-se a técnica de Strittmater (1973), onde o material foi fervido por três minutos em etanol 95% e depois novamente fervido por mais três minutos numa solução de Hidróxido de sódio 5% e etanol 95%. Em seguida, as folhas foram lavadas em água destilada e clarificadas na solução de hipoclorito de sódio a 50% (o tempo variou de espécie para espécie). O material foi lavado novamente na água destilada, desidratado em série etanólica e corado com safranina 1% em etanol 70%. As folhas foram distendidas em placas de vidro, tendo como meio de montagem resina Entellan ou Bálsamo-do-Canadá.

Para a descrição e classificação dos padrões de nervação foram utilizados dois autores: os tipos básicos definidos por Hickey (1979), para o desenvolvimento da aréola, venação última marginal e terminações vasculares; e a terminologia do LAWG (1999), para o espaçamento e ângulos entre as nervuras secundárias; classificação das intersecundárias; e categorias das nervuras terciárias e quaternárias.

Para visão geral das folhas diafanizadas foi preciso fotografar com a máquina Leica MDA estativa, utilizando uma caixa de luz por baixo destas placas (negatoscópio). Posteriormente as fotos foram digitalizadas e trabalhadas no software de editor de imagem Paint.

Os esquemas do pecíolo foram desenhados à mão, utilizando uma fotomicrografia da região como modelo. Posteriormente, este desenho foi digitalizado e trabalhado no software de editor de imagem Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems 2002).

Tanto na folha como no pecíolo, algumas espécies não apresentaram cristais nos cortes transversais, sendo necessário a realização de macerados com a técnica proposta por Franklin (1945), para confirmar a ausência destes cristais. Para verificar a composição química dos cristais foi utilizado o teste com ácido acético glacial, para a distinção entre carbonato de cálcio e oxalato de cálcio (Kraus *et al* 1998).

As análises anatômicas das folhas e dos pecíolos foram realizadas em microscópio óptico com as principais estruturas registradas no Sistema de Digitalização de Imagens (IM50) acoplado ao microscópio Leica DMBL, sendo este também utilizado para a constatação da presença de cristais através do uso da luz polarizada.

3.2.2. Mapeamento dos caracteres anatômicos

Após a delimitação dos caracteres anatômicos da folha e do pecíolo, utilizou-se o programa MacClade 4.0 (Maddison & Maddison 2000). Com este programa foi possível: montar a matriz, onde os caracteres anatômicos multiestados não foram ordenados e não tiveram pesos diferentes; desenhar o cladograma de *Pilocarpus* e gêneros relacionados de acordo com a filogenia proposta por Dias *et al.* (submetido); e mapear os dados da matriz na árvore desenhada, analisando a evolução dos caracteres.

É importante mencionar que somente 12 dos 23 terminais propostos na filogenia por Dias *et al.* (submetido) é que foram analisados. Os 11 terminais que não foram analisados, estes foram acrescentados na matriz, e seus estados foram simbolizados por uma interrogação (?). Isso foi feito, porque o programa utilizado para o mapeamento consegue reconstruir a história evolutiva dos caracteres, inferindo no possível estado de caráter das espécies ancestrais da árvore. Além disso, 3 dos 32 caracteres levantados, possuíam estados que não se aplicam em alguns terminais analisados, sendo simbolizados por um traço (-).

4. RESULTADOS

4.1. Anatomia da lâmina foliar

4.1.1. Análise em varredura da superfície foliar

Caráter 1 – Ornamentação da cutícula foliar na face adaxial: lisa (0); estriada (1)

Caráter 2 – Ornamentação da cutícula foliar na face abaxial: lisa (0); estriada (1)

De acordo com a análise obtida pela microscopia de varredura, as espécies apresentam, por toda a extensão da face adaxial, uma cutícula ornamentada com finas estrias (Figs. 8-10) exceto em *Galipea trifoliata* e *Raulinoa echinata* (Fig. 11), as quais apresentam a cutícula lisa. Já na face abaxial, apenas *Pilocarpus pauciflorus*, *Raulinoa echinata* e *Balfourodendron riedelianum* não apresentam cutícula com estrias. Nas demais espécies, a cutícula pode ocorrer por toda a face, como em *Esenbeckia leiocarpa* (Fig. 12), ou estar presente próximo a alguns estômatos e tricomas, como nas demais espécies (Fig. 13). Em uma mesma espécie, como em *G. trifoliata*, observam-se estômatos circundados com e sem a cutícula estriada (Figs. 13-14). Adicionalmente, a forma como estas cutículas circundam o estômato, não

apresenta um padrão por espécie (Figs. 15-16). Em algumas espécies, como em *Pilocarpus microphyllus*, a cutícula estriada se estende, ligando um estômato a outro (Fig. 17).

4.1.2. Tricomas

Caráter 3 – Tricoma tector na lâmina foliar: ausente (0); presente (1)

Em ambas as faces da epiderme, tricomas tectores e glandulares foram observados (Fig. 18). O tricoma tector é do tipo unicelular filiforme presente em quase todas as espécies (Figs. 18-19), exceto *Raulinoa echinata*.

Todas as espécies apresentam tricomas glandulares, podendo ser capitados ou peltados.

Caráter 4 – Tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar: pedúnculo multicelular unisseriado, com região apical unicelular (0); pedúnculo multicelular unisseriado com região apical multicelular (1); Pedúnculo unicelular com região apical unicelular (2); pedúnculo unicelular com região apical multicelular (3)

Os tricomas capitados consistem de uma célula basal, uma ou várias células pedunculares, com parede externa cutinizada, e a região apical que pode ser uni ou multicelular. Diante do número de células do pedúnculo e do ápice, os tricomas capitados diferem em quatro tipos:

1- pedúnculo multicelular unisseriado, com região apical piriforme unicelular em *G. trifoliata* (Figs. 20-21);

2- pedúnculo multicelular unisseriado inserido em depressão na epiderme, com a região apical circular multicelular em *E. leiocarpa* (Figs. 22-23);

3- pedúnculo unicelular localizado entre as células na epiderme, com região apical globular unicelular de paredes delgadas em *Pilocarpus spicatus* (Fig. 24), *Pilocarpus giganteus*, *Pilocarpus pauciflorus* (Fig. 25) e *Pilocarpus microphyllus* (Fig. 26);

4- pedúnculo unicelular, com a região apical multicelular em *B. riedelianum* (Figs. 27-28) e *Helietta apiculata*.

Caráter 5 – Tricomas glandulares peltados na lâmina foliar: ausente (0); presente (1)

A lâmina foliar de *Metrodorea flavida* (Fig. 29), *Pilocarpus jaborandi*, *Helietta apiculata* (Fig. 30), *Pilocarpus alatus* e *R. echinata* (Figs. 31-32) possuem tricomas do tipo peltado (subséssil). Estes tricomas são constituídos por uma célula peduncular inserido em

depressão na epiderme, e uma região apical multicelular, distribuída radialmente em dois círculos concêntricos, que envolvem a célula peduncular.

4.1.3. Contorno das células epidérmicas em vista frontal

Caráter 6 – Paredes das células epidérmicas na face adaxial em vista frontal: retas (0); sinuosas (1)

Caráter 7 – Paredes das células epidérmicas na face abaxial em vista frontal: retas (0); sinuosas (1)

Em vista frontal (Figs. 33-56), as células epidérmicas, em ambas as faces, possuem paredes retas na maioria das espécies (Figs. 34, 37-43, 46, 49-55). Paredes sinuosas, tanto na face abaxial como na adaxial, ocorrem em *G. trifoliata* (Figs. 33, 45) e *M. flavida* (Figs. 35, 47), e só na face adaxial em *P. alatus* (Fig. 36) e *P. spicatus* (Fig. 44). Nas espécies em que as paredes são retas, a epiderme, em ambas as faces, apresenta o contorno variando de quadrangular a pentagonal em *E. leiocarpa* (Figs. 34, 46), pentagonal a hexagonal só na face adaxial em *P. jaborandi* (Fig. 37) e nas demais espécies variam de retangular a pentagonal (Figs. 38-43, 48-56).

4.1.4. Estômatos

Caráter 8 – Tipos de estômatos: anomocítico (0); tetracítico (1)

As folhas de todas as espécies são hipostomáticas (Figs. 45-56), observando-se dois tipos: anomocítico em *G. trifoliata* (Fig. 45), *E. leiocarpa* (Fig. 46), *M. flavida* (Fig. 46), *P. microphyllus* (Fig. 50), *H. apiculata* (Fig. 52), e *B. riedelianum* (Fig. 54); e tetracítico, com quatro células subsidiárias, sendo duas oblíquas na porção superior e duas oblíquas na porção inferior em *P. alatus* (Fig. 48), *P. jaborandi* (Fig. 49), *P. pauciflorus* (Fig. 51), *R. echinata* (Fig. 52), *P. giganteus* (Fig. 55) e *P. spicatus* (Fig. 56).

4.1.5. Lúme das células epidérmicas em secção transversal

Caráter 9 – Relação de tamanho entre as células epidérmicas na face adaxial x abaxial (secção transversal): adaxial > abaxial (0); adaxial = abaxial (1)

Em secções transversais, todas as espécies estudadas apresentam a epiderme unisseriada, com contorno variando de quadrangular a retangular em ambas as faces (Figs. 57-

68). As células da face adaxial têm o mesmo tamanho (lúme) das células da face abaxial em quase todos os indivíduos, exceto em *G. trifoliata* (Fig. 59), *R. echinata* (Fig. 60), *H. apiculata* (Fig. 66) e *P. giganteus* (Fig. 67), que apresentam as células da face adaxial maior do que a abaxial. Em *H. apiculata* (Fig. 66), algumas células da epiderme apresentam divisão periclinal da parede. Os estômatos ocupam o mesmo nível das células da epiderme em todas as espécies (Fig. 63).

4.1.6. Mesofilo

Caráter 10 – Número de camadas do parênquima paliçádico: uma camada (0); mais de uma camada (1)

Todos os indivíduos exibem, em secção transversal, a região mediana da lâmina foliar com organização dorsiventral, sendo o parênquima paliçádico uniestratificado na face adaxial (Figs. 57-65, 67-68), com exceção de *H. apiculata* (Fig. 66), que possui 2-3 camadas de parênquima paliçádico.

Caráter 11 – Formato das células do parênquima paliçádico: retangular (0); paliçada (1)

As células do parênquima paliçádico têm formato de paliçada em quase todas as espécies, com exceção *G. trifoliata* (Fig. 59), que possui um formato mais retangular.

A proporção entre o número de células do parênquima paliçádico e o número de células da epiderme é de 1:1 em *P. alatus* (Fig. 63), *P. giganteus* (Fig. 67) e *P. spicatus* (Fig. 68); 3:1 em *P. jaborandi* (Fig. 64), *B. riedelianum* (Fig. 65) e *H. apiculata* (Fig. 66); e de 2:1 nas demais espécies (Fig. 57- 61).

Todas as espécies possuem uma camada de células coletoras entre o parênquima paliçádico e o lacunoso (Figs. 57-68). O número de camadas celulares do parênquima lacunoso varia entre cinco, como em *G. trifoliata* (Fig. 59), a treze em *P. jaborandi* (Fig. 64). Em todas as espécies, este tecido é composto por células braciiformes frouxamente dispostas (Fig. 57-68), sendo que alguns indivíduos apresentam grandes espaços intercelulares no mesofilo, como em *P. pauciflorus* (Fig. 61), *P. microphyllus* (Fig. 62), *P. alatus* (Fig. 63) e *P. jaborandi* (Fig. 64).

Caráter 12 – Cavidades secretoras na folha: ausente(0); presente (1)

Interno a epiderme, em ambas as faces, todos os indivíduos apresentam estruturas secretoras (Figs. 69-83). *Esenbeckia leiocarpa* (Figs. 69, 76) é a única espécie que só possui células secretoras, ao invés de cavidades, localizadas interno ao parênquima paliçádico e inseridas no parênquima lacunoso. As demais espécies possuem cavidades secretoras que apresentam, tanto em secção transversal (Figs. 69-75), como longitudinal (Figs. 76-83) da lâmina foliar, a ocorrência das células do epitélio, sugerindo que a origem destas seja esquizo-lisígena. As cavidades secretoras também podem ocorrer na região da nervura principal.

Caráter 13 – Cristais no parênquima paliçádico: ausente (0); presente (1)

Caráter 14 – Tipos de cristais no parênquima paliçádico: cristais em forma de bastão (0); drusas de oxalato de cálcio (1)

Quase todas as espécies possuem idioblastos com cristais no parênquima paliçádico (Figs. 84-96), exceto *G. trifoliata*. Esta espécie apresenta ráfides, que são melhores observadas na folha diafanizada. As células do parênquima paliçádico apresentam paredes transversais ao eixo maior da célula e contém drusas de oxalato de cálcio em todas as espécies de *Pilocarpus* (Figs. 84-86, 91-92), e cristais em forma de bastonete nos demais gêneros (Figs. 87-88, 93-94). Os cristais também podem estar distribuídos no parênquima lacunoso (Fig. 86), no periciclo (Figs. 89-90) e no floema (Figs. 95-96) na região da nervura principal.

4.1.7. Contorno da nervura principal

Na região da nervura principal (Figs. 97-120) de algumas espécies estudadas, como *M. flavida*, *P. alatus*, *P. giganteus*, *P. spicatus*, *G. trifoliata* e *B. riedelianum*, as folhas são biconvexas (Figs. 97-102). Entretanto, em *E. leiocarpa*, *R. echinata*, *P. pauciflorus* e *P. jaborandi* apresentam a face adaxial plana e a abaxial, convexa (Fig. 103-106), embora em *E. leiocarpa* (Fig. 103) a face adaxial possa apresentar uma discreta convexidade. Em *P. microphyllus* e *H. apiculata* a superfície adaxial é convexa e a abaxial, plana (Fig. 107-108). Estudos preliminares em ápice e base foliar destas espécies mostram que o contorno da nervura mediana pode variar em uma mesma espécie. Por exemplo, em *P. jaborandi*, na base foliar o contorno é biconvexo, enquanto que no meio e no ápice é plano-convexo (Fig. 106). Além disso, *P. pauciflorus* e *H. apiculata* também apresentam variação do contorno na nervura ao longo da lâmina foliar. No entanto, *P. alatus* e *P. spicatus* mantêm o mesmo padrão biconvexo na base, meio e ápice. Portanto, o contorno da nervura principal não pode ser usado como caráter, uma vez que numa mesma espécie, o estado não se mantém constante.

4.1.8 Sistema vascular

Caráter 15 – Forma do sistema vascular (unidade vascular) na lâmina foliar: aberto (0); fechado (1)

A forma do sistema vascular (unidade vascular) na nervura mediana apresenta-se como um arco fechado em quase todas as espécies, com exceção a *P. microphyllus* que é aberto (Figs. 108, 115). Em *M. flavida* (Figs. 98, 111) e *P. alatus* (Figs. 99, 113), mesmo apresentando um arco fechado, observa-se que há um encontro entre as células com paredes secundárias lignificadas do periciclo (provavelmente fibras pericíclicas) e as fibras do xilema.

A unidade vascular central é do tipo colateral em todas as espécies (Figs. 97-120), variando na continuidade das fibras pericíclicas que circundam os feixes. No entanto, em *E. leiocarpa* (Fig. 109) se observa que, na região mediana da lâmina foliar, estas fibras ainda não estão completamente diferenciadas, mas analisando a base foliar, as fibras estão diferenciadas. Presença de medula formada por células parenquimáticas em todos os representantes.

4.1.9 Domácias

Caráter 16 – Domácias: ausente (0); presente (1)

Domácias foram registradas somente em *Balfourodendron riedelianum* (Figs. 121-126), estando presentes nas axilas da nervura mediana, na face abaxial da lâmina foliar (Figs. 121-122). Estas estruturas estão em toda a extensão da lâmina, sendo do tipo em cripta. Observa-se que a cripta é formada apenas pela redução do parênquima lacunoso (Figs. 123-124). Tricomas tectores unicelulares estão presente apenas próximo à região de abertura da cripta (Figs. 121-122, 125-126).

4.2. Venação

Em todas as folhas estudadas, o tipo de venação é pinado, ou seja, possui uma única nervura primária. Além disso, todas apresentam um padrão de nervação foliar do tipo camptódromo-broquidódromo, onde as nervuras secundárias formam uma série de arcos próximos ao bordo da lâmina foliar (Figs. 127-133).

Caráter 17 – Ângulo das nervuras secundárias: uniforme (0); aumenta em direção à base (1); diminui em direção à base (2)

O espaçamento entre as nervuras secundárias é irregular em todas as espécies. No entanto, o ângulo formado por estas nervuras pode aumentar em direção a base da folha, como em *P. jaborandi* (Fig. 132) e *B. riedelianum*, diminuir em direção a base, como em *M. flavida* e *H. apiculata* (Fig. 129); ou permanecerem uniformes por toda a folha, como observado nas demais espécies (Figs. 127, 128, 130, 131 e 133)

Caráter 18 – Ocorrência de intersecundárias: ausente (0); fraca (1); forte (2)

A maioria das espécies apresenta nervuras intersecundárias, que tem largura e percurso similar às nervuras secundárias, mas diferem por serem mais finas e não alcançarem à margem. As intersecundárias podem ser fracas (Figs. 128-130), como em *G. trifoliolata*, *P. alatus*, *M. flavida*, *H. apiculata*, *B. riedelianum*, *R. echinata*, ou fortes (Figs. 127, 131-133), como nas demais espécies de *Pilocarpus*. Somente *E. leiocarpa* não possui intersecundárias.

Caráter 19 – Venação última marginal: incompleta (0); em forma de arco (1)

A venação última marginal - “*marginal ultimate venation*” é incompleta, formada por terminações vasculares livres nas folhas de *P. microphyllus* (Fig. 134), *P. alatus* (Fig. 135), *H. apiculata* (Fig. 136), *E. leiocarpa* (Fig. 137), *B. riedelianum*. Nas demais espécies, a venação última marginal é na forma de arco (Figs. 138-143).

Caráter 20 – Categoria da nervura terciária: aleatoriamente reticulada (0); dicotomizada (1); percurrente alternada (2)

As nervuras terciárias e quaternárias também possuem uma classificação de acordo com o arranjo que compõem a folha. Nas espécies estudadas, as nervuras terciárias são do tipo: percurrente alternada - “*alternate percurrent*”, onde as terciárias cruzam as secundárias com uma brusca descontinuidade angular, como nas demais espécies (Fig. 144-146); dicotomizada - “*dichotomizing*”, onde as terciárias são ramificadas livremente, como em *P. microphyllus* (Fig. 147) e aleatoriamente reticulada - “*random reticulatè*”, no qual estas nervuras se unem com outras terciárias ou secundárias como em *H. apiculata* (Fig. 148) e *R. echinata* (Fig. 149).

Caráter 21 – Categoria da nervura quaternária: reticulada poligonal regular (0); dicotomizada (1); percurrente alternada (2)

Quanto às nervuras quaternárias, as folhas estudadas também apresentam 3 tipos: reticulada regular poligonal - “*regular polygonal reticulatè*”, onde as quaternárias se unem com outras nervuras formando polígonos de tamanho e forma regular, presente em *G. trifoliata* (Fig. 145) e *P. pauciflorus*, dicotomizada - “*dichotomizing*”, no qual as quaternárias são ramificadas livremente e são a mais perfeita ordem que a folha exhibe, como em *P. microphyllus* (Fig. 147), *P. alatus*, *H. apiculata* (Fig. 148) e *R. echinata* (Fig. 149); e nas demais espécies, percurrente alternada - “*alternate percurrent*” (Figs. 144, 146).

Caráter 22 – Desenvolvimento das aréolas: incompleta (0); imperfeita (1)

As aréolas, determinadas pelas nervuras terciárias e de ordem superior, são classificadas de acordo com o seu desenvolvimento podendo ser de 4 tipos: bem desenvolvida, imperfeitas, incompletas e ausentes. A maioria das folhas estudadas apresenta a aréola imperfeita (Fig. 150-155), onde as nervuras formam malhas de formato irregular, mas não variando muito o tamanho. Entretanto, em *R. echinata*, *H. apiculata* e *P. microphyllus* (Figs. 156-161), a aréola é incompleta, a qual apresenta um ou mais lado da rede de nervuras não limitado, dando origem a uma grande malha de tamanhos e formas “anômalos”.

Caráter 23 – Terminações das nervuras: simples (0); ramificadas (1)

Na mesma folha, as terminações vasculares podem ser simples ou ramificadas. Nas espécies estudadas nota-se o predomínio destas terminações serem simples, em *P. jaborandi*, *P. alatus* (Fig. 155), *P. giganteus*, *H. apiculata* (Figs. 160-161) e *B. riedelianum*, e ramificadas nas demais espécies (Figs. 150-154, 156-159). Em *P. microphyllus* (Figs. 154-155), observa-se a ocorrência de idioblastos traqueoidais nas terminações vasculares.

4.3. Anatomia do Pecíolo

Caráter 24 – Forma das células epidérmicas do pecíolo em secção transversal: quadrangular a retangular (0); papilosa (1)

A epiderme tem aspecto papiloso em *H. apiculata*, *E. leiocarpa* e *P. alatus* (Figs. 162-165); quadrangular a retangular em *P. pauciflorus*, *R. echinata*, *G. trifoliata*, *B. riedelianum*, *P. spicatus*, *P. jaborandi*, *P. giganteus* e *P. microphyllus* (Figs. 166-172). Em algumas espécies, a epiderme foi parcialmente substituída pela periderme como em *B. riedelianum*

(Fig. 173) ou totalmente substituída, como em *M. flavida* (Fig. 174), podendo apresentar lenticelas (Fig. 175).

Caráter 25 – Tricoma tector no pecíolo: ausente (0); presente (1)

A maioria das espécies apresenta tricomas, exceto *P. pauciflorus* e *P. giganteus*. Todos os indivíduos possuem tricoma tector unicelular filiforme (Figs. 162, 165, 168).

Caráter 26 – Tricoma glandular no pecíolo: ausente (0); presente (1)

Caráter 27 – Tipos de Tricomas glandulares no pecíolo: capitado (0); peltado (1)

Além do tricoma tector, duas espécies apresentam tricomas glandulares, sendo do tipo capitado em *E. leiocarpa* (Fig. 163) e do peltado em *H. apiculata* (Fig. 164), ambas com pedúnculo multicelular unisseriada e região apical multicelular.

Caráter 28 – Cavidade secretora no pecíolo: ausente(0); presente (1)

Interno a epiderme, todas as espécies apresentam estruturas secretoras, que podem ser cavidades e/ou células. As cavidades secretoras estão localizadas próximo à epiderme e provavelmente sua origem seja esquizo-lisígenas (Figs. 167, 170, 172), já as células secretoras são encontradas em toda região cortical, no xilema, no floema e na medula.

Em quase todos os representantes as duas estruturas secretoras foram observadas, exceto em *E. leiocarpa*, que apresenta somente células secretoras no córtex e na medula.

Além disso, células esclerenquimáticas são observadas próximo à epiderme apenas em *M. flavida* e *P. giganteus* (Figs. 175-176).

Caráter 29 – Ráfides no pecíolo: ausente (0); presente (1)

Caráter 30 – Cristais prismáticos no pecíolo: ausente (0); presente (1)

Caráter 31 – Drusas de oxalato de cálcio no pecíolo: ausente (0); Presente (1)

Todos os indivíduos apresentam idioblastos contendo cristais (Figs. 177-184), sendo drusas de oxalato de cálcio em todas as espécies de *Pilocarpus* (Figs. 177-180), ráfides e cristais prismáticos em *G. trifoliata* (Figs. 281-182), e apenas cristais prismáticos nas demais espécies (Figs. 183-184). Estes idioblastos estão presentes no córtex, sistema vascular e medular do pecíolo.

4.3.1. Contorno do pecíolo e sistema vascular

O contorno do pecíolo é côncavo-convexo em *B. riedelianum*, *H. apiculata*, *P. spicatus*, *M. flavida*, *R. echinata* e *P. alatus* (Figs. 185-187, 191); plano na face adaxial e convexo na face abaxial em *G. trifoliata*, *P. jaborandi*, *P. giganteus* e *P. microphyllus* (Figs. 188, 192-195); e circular em *E. leiocarpa* (Fig. 196).

Quanto ao sistema vascular, são observados 2 tipos de organizações na região basal (proximal) do pecíolo: o cilindro fechado com medula ou vários cilindros livres. O primeiro tipo ocorre em *G. trifoliata* (Fig. 192), *P. jaborandi* (Fig. 193) e *E. leiocarpa* (Fig. 196). No segundo tipo, o sistema vascular pode ser composto por 3 cilindros vasculares livres, sendo o central mais proeminente e acompanhado por dois menores, formando um arco, como em *H. apiculata* (Fig. 186), *P. spicatus* (Fig. 187), *P. pauciflorus* (Fig. 188), *R. echinata* (Fig. 189) e *P. microphyllus* (Fig. 194); ou ter mais de três cilindros vasculares livres, com o cilindro central mais proeminente do que os demais, como em *B. riedelianum* (Fig. 185), *P. giganteus* (Fig. 188), *M. flavida* (Fig. 190), *P. alatus* (Fig. 191).

Entretanto, todas as espécies que possuem cilindros vasculares livres na região basal do pecíolo tornam-se, em um nível mais elevado, um único cilindro fechado e com medula (Figs. 197-215). Em *P. giganteus* pode ser observado esta transição, onde um dos cilindros menores está se unindo ao central (Figs. 197-198). Além desta fusão dos cilindros, verifica-se que o pecíolo apresenta contorno diferente de acordo com a região. Assim, em *B. riedelianum* (Figs. 202-203), a região basal possui o contorno côncavo-convexo e, num plano mais acima, torna-se circular. Por este motivo o contorno do pecíolo e a forma do sistema vascular não foram utilizados como caráter.

Outra observação é que em *M. flavida* (Figs. 214-215), na região basal do pecíolo, onde os cilindros ainda estão livres, observa-se um pequeno feixe anfigasal que foi produzido pelo cilindro central. Na altura média do pecíolo, este feixe anfigasal aparece incluso no cilindro vascular fechado (Muntoreanu *et al.* em preparação).

Caráter 32 – Células do periciclo no pecíolo: parenquimática (0); esclerenquimática (1)

Todas as espécies de *Pilocarpus*, além de *R. echinata* e *M. flavida*, apresentam fibras pericíclicas circundando não continuamente o sistema vascular (Fig. 216-221), enquanto que nas demais espécies não foram observadas (Fig. 223-227). No entanto, em *P. microphyllus* (Fig. 221) e *R. echinata* (Fig. 222) nota-se que as fibras pericíclicas estão pouco diferenciadas na região basal do pecíolo.

4.4. Mapeamento dos caracteres

A lista com os 32 caracteres anatômicos descritos acima encontra-se na tabela 2 e a matriz na tabela 3.

Tabela 2. Lista dos caracteres analisados e seus respectivos estados.

1- Ornamentação da cutícula foliar na face adaxial	Presente (1)
Lisa (0)	17- Ângulo das nervuras secundárias
Estriada (1)	Uniforme (0)
2- Ornamentação da cutícula foliar na face abaxial	Aumenta em direção a base (1)
Lisa (0)	Diminui em direção a base (2)
Estriada (1)	18- Ocorrência de intersecundárias
3- Tricoma tector da folha	Ausente (0)
Ausente (0)	Fraca (1)
Presente (1)	Forte (2)
4- Tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar	19- Venação última marginal
Pedúnculo multicelular unisseriado, com região apical unicelular (0)	Incompleta (0)
Pedúnculo multicelular unisseriado com região apical multicelular (1)	Forma de arco (1)
Pedúnculo unicelular com região apical unicelular (2)	20- Categoria da nervura terciária
Pedúnculo unicelular com região apical multicelular (3)	Aleatoriamente reticulada (0)
5- Tricomas glandulares peltados na lâmina foliar	Dicotomizada (1)
Ausente (0)	Pecurrente alternada (2)
Presente (1)	21- Categoria da nervura quaternária
6- Paredes das células epidérmicas na face adaxial em vista frontal	Reticulado poligonal regular (0)
Retas (0)	Dicotomizada (1)
Sinuosas (1)	Pecurrente alternada (2)
7- Paredes das células epidérmicas na face abaxial em vista frontal	22- Desenvolvimento das aréolas
Retas (0)	Incompleta (0)
Sinuosas (1)	Imperfeita (1)
8- Tipos de estômatos	23- Terminações das nervuras
Anomocítico (0)	Simples (0)
Tetracítico (1)	Ramificada (1)
9- Relação de tamanho entre as células da epiderme face adaxial X abaxial no mesofilo (secção transversal)	24- Forma das células epidérmicas no pecíolo (secção transversal)
Adaxial > Abaxial (0)	Quadrangular a Retangular (0)
Adaxial = Abaxial (1)	Papilosa (1)
10- Número de camadas do parênquima paliçádico	25- Tricoma tector no pecíolo
1 camada (0)	Ausente (0)
Mais de 1 camada (1)	Presente (1)
11- Formato das células do parênquima paliçádico	26- Tricoma glandular no pecíolo
Retangular (0)	Ausente (0)
Cilíndrico (1)	Presente (1)
12- Cavidades secretoras na folha	27- Tipo de tricoma glandular no pecíolo
Ausente (0)	Capitado (0)
Presente (1)	Peltado (1)
13- Cristais no parênquima paliçádico	28- Cavidade secretora no pecíolo
Ausente (0)	Ausente(0)
Presente (1)	Presente (1)
14- Tipos de cristais no parênquima paliçádico	29- Ráfides no pecíolo
Cristais em forma de bastão (0)	Ausente (0)
	Presente (1)
	30- Cristais prismáticos no pecíolo
	Ausente (0)
	Presente (1)
	Só cristais prismáticos (1)
	31- Drusas de oxalato de cálcio (2)
	Ausente (0)

Drusas de Oxalato de cálcio (1)	Presente (1)
15- Forma do sistema vascular foliar	32- Células do periciclo no pecíolo
Aberto (0)	Parenquimática (0)
Fechado (1)	Esclerenquimática(1)
16- Domácias	
Ausente (0)	

Tabela 3. Matriz com caracteres anatômicos e seus respectivos estados em *Pilocarpus* e gêneros relacionados.

Caráter	Especies																						
	G t r	P m i	P p a	P s p	P g i	P a L	P j a	E l E	R e c	M f L	H a P	B r i	P p e r	P s u	P t r i	P c a	P d e	P g r	P t r a n	P p e n	P m a	P r a	P r i
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
2	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
4	0	2	2	2	2	-	-	1	-	-	3	3	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
5	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
6	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
8	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
9	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
11	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
12	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
13	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
14	-	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
15	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
17	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
18	1	2	2	2	2	2	2	0	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
19	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
20	2	1	2	2	2	2	2	2	0	2	1	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
21	0	1	0	2	2	1	2	2	1	2	2	2	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
22	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
23	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
24	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
25	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
26	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
27	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	1	-	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
28	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
30	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

31	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?
32	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Gtr - *Galipea trifoliata*, **Pmi** - *Pilocarpus microphyllus*, **Ppa** - *Pilocarpus pauciflorus*, **Psp** - *Pilocarpus spicatus*, **Pgi** - *Pilocarpus giganteus*, **Pal** - *Pilocarpus alatus*, **Pja** - *Pilocarpus jaborandi*, **Ele** - *Esenbeckia leiocarpa*, **Rec** - *Raulinoa echinata*, **Mfl** - *Metrodorea flavida*, **Hap** - *Helietta apiculata*, **Bri** - *Balfourodendron riedelianum*, **Pper** - *Pilocarpus peruvianus*, **Psu** - *Pilocarpus sulcatus*, **Ptri** - *Pilocarpus trifoliolatus*, **Pca** - *Pilocarpus carajaensis*, **Pde** - *Pilocarpus demerarae*, **Pgr** - *Pilocarpus grandiflorus*, **Ptra** - *Pilocarpus trachylophus*, **Ppen** - *Pilocarpus pennatifolius*; **Pma** - *Pilocarpus manuensis*, **Pra** - *Pilocarpus racemosus*, **Pri** - *Pilocarpus riedelianus*, (?) - espécies que não foram analisadas neste trabalho, e que portanto, não se conhece o estado de caráter destes; (-) - não se aplica.

Após a construção da matriz (tabela 2), cada caráter foi mapeado utilizando a árvore filogenética proposta por Dias *et al.* (submetido). Neste trabalho, os autores incluíram como grupo externo seis representantes de gêneros relacionados a *Pilocarpus*, onde o enraizamento foi feito em *Galipea*, obtendo uma árvore baseada em caracteres morfológicos usando-se método bayesiano, onde *Pilocarpus* surge como grupo monofilético, e os demais representantes formam um grupo distal (*Esenbeckia*, *Raulinoa*, *Metrodorea*, *Helietta* e *Balfourodendron*).

Fig 228 Filogenia de *Pilocarpus* (em azul) e gêneros relacionados (em amarelo) apresentada por Dias *et al.* (submetido) (modificado).

O mapeamento forneceu 32 árvores, as quais foram agrupadas de acordo com o número de caracteres que alguns terminais apresentaram em comum, fornecendo os seguintes resultados (ver figuras 229-238):

Nas árvores mapeadas com os caracteres 4, 12, 14, 27 e 28, observa-se que *E. leiocarpa*, diverge dos demais terminais (Fig. 229 A-D).

O formato retangular das células do parênquima paliçádico (Fig. 230 A), ausência de cristais no parênquima paliçádico (Fig. 230 B) e presença de ráfides no pecíolo (Fig. 230 C) surgem uma única vez no grupo em *G. trifoliata*, separando-a do restante dos terminais. Adicionalmente, na árvore do caráter 4 (Fig. 230 D), *G. trifoliata* também é a única espécie que possui tricoma glandular capitado, com pedúnculo multicelular unisseriado e regial apical unicelular.

Além disso, o mapeamento dos caracteres 6 e 7 mostram árvores muito semelhantes (Fig. 231 A-B). Em ambos os cladogramas, o estado referente a parede sinuosa das células epidérmicas surge poucas vezes, além de estar presente nas espécies de *G. trifoliata* e *M. flavida*. A única diferença destes dois cladogramas é que no caráter 6 (Fig. 231 A), o estado parede sinuosa também surge em pelo menos duas espécies de *Pilocarpus*, embora apareçam neste grupo dois terminais que se desconhece o estado (equívoco). Outra observação é que, no grupo distal (*Esenbeckia*, *Raulinoa*, *Metrodorea*, *Helietta* e *Balfourodendron*), em ambas as árvores, a espécie *M. flavida* diverge dos demais gêneros por apresentar paredes sinuosas.

Ainda em relação ao grupo distal, nota-se que *R. echinata* e *H. apiculata* são os dois representantes que divergem deste grupo por apresentarem os seguintes estados: células da epiderme foliar face adaxial > abaxial (Fig. 232 A), nervuras terciárias aleatoriamente reticulada (Fig. 232 B), nervuras quaternárias dicotomizada (Fig. 232 C) e aréolas incompletas (Fig. 232 D). Os estados referentes aos caracteres 9 (Fig. 232 A) e 21 (Fig. 232 C) surgem no mínimo em mais dois terminais dos cladogramas, mas não se pode afirmar a quantidade exata de terminais que esse estado surgiu, uma vez que algumas espécies do grupo de *Pilocarpus* possuem estados de caráter incertos (equívocos).

Já na árvore do caráter 22 (Fig. 232 D), o estado aréola incompleta separa *P. microphyllus* do grupo de *Pilocarpus*. Esta situação mencionada no caráter 22, também ocorre no mapeamento do caráter 8 (Fig. 232 F), onde o estado estômatos anomocíticos surge apenas em *P. microphyllus*. No entanto, nas árvores dos caracteres 15 (Fig. 232 E) e 20 (Fig. 232 B), *P. microphyllus* além de divergir do grupo de *Pilocarpus*, é o único terminal que apresenta os estados sistema vascular aberto e nervura terciária dicotomizada.

A ausência do tricoma tector na lâmina foliar (Fig. 233 A) mostra que *R. echinata* diverge dos demais representantes. No mapeamento de outros caracteres como ornamentação cuticular na lâmina foliar na face adaxial (Fig. 233 B) e tipo de estômato (Fig. 233 C), *R. echinata* também diverge em relação ao clado formado pelo grupo distal. No entanto, no caráter 1 (Fig. 233 B), somente *G. trifoliata* apresenta o mesmo estado de *R. echinata*, enquanto que no caráter 8 (Fig. 233 C), quase todas as espécies de *Pilocarpus*, exceto *P. microphyllus*, possuem o mesmo estado que *Raulinoa*.

Os estados, terminações simples das nervuras (Fig. 234 A), células pericíclicas parenquimáticas (Fig. 234 B) e tricomas glandulares capitados na lâmina foliar, com pedúnculo e região apical unicelulares, (Fig. 234 C), surgem em dois representantes (*Helietta* e *Balfourodendron*) que pertencem ao grupo distal. Adicionalmente, o periciclo constituído por células parenquimáticas (Fig. 234 B), aparece só mais uma vez em *Galipea*, enquanto que as terminações simples das nervuras (Fig. 234 B) surgem em mais da metade dos terminais da árvore.

As árvores mapeadas com os caracteres 24 (Fig. 235 A) e 26 (Fig. 235 B) são muito semelhantes, mostrando que *H. apiculata* e *E. leiocarpa* divergem em relação ao grupo distal, por apresentarem epiderme papilosa e tricoma glandular, ambos no pecíolo. Além disso, só uma espécie de *Pilocarpus* apresenta a epiderme papilosa. Outra observação é que *H. apiculata* é o único terminal que diverge das demais espécies por possuir mais de uma camada de parênquima paliçádico (Fig. 235 C) e tricoma glandular peltado no pecíolo (Fig. 235 D).

O mapeamento dos caracteres 14 (Fig. 236 A), 30 (Fig. 236 B) e 31 (Fig. 236 C) mostra que o clado formado por todas as espécies *Pilocarpus* diverge dos demais terminais por apresentarem drusas de oxalato de cálcio no parênquima paliçádico e no pecíolo, enquanto que a presença de cristais prismáticos tanto no parênquima paliçádico quanto no pecíolo é característico dos gêneros relacionados a *Pilocarpus*.

No clado formado por *Esenbeckia*, *Raulinoa*, *Metrodorea*, *Helietta* e *Balfourodendron*, os caracteres 2 (Fig. 237 A) e 19 (Fig. 237 B) apresentam os terminais *Raulinoa* e *Balfourodendron* divergindo. No entanto, no mapeamento do caráter 2, uma espécie de *Pilocarpus* apresentou o mesmo estado que *Raulinoa* e *Balfourodendron*, enquanto que na árvore do caráter 19 (Fig. 237 B), os estados estão mais distribuídos entre os terminais. Além disso, a presença de domácia foi observada somente em *Balfourodendron* (Fig. 237 C).

Quanto as árvores mapeadas com os caracteres 5 (Fig. 238 A), 17 (Fig. 238 B) e 25 (Fig. 238 C) não apresentam nenhuma relação com as demais árvores mapeadas. No caráter 5 (Fig. 238 A), observa-se que a distribuição dos estados (presente e ausente) está quase proporcional. No caráter 17 (Fig. 238 B), o cladograma formado pelas espécies de *Esenbeckia*, *Raulinoa*, *Metrodorea*, *Heliotta* e *Balfourodendron* possuem os três estados relacionados ao ângulo das nervuras secundárias, embora o estado uniforme surge na maioria dos terminais. Com relação ao caráter 27 (Fig. 238 C), quase todas as espécies apresentam tricoma tector no pecíolo. Só duas espécies de *Pilocarpus* não possuem tal estado, e outras duas desse mesmo grupo, possuem incerteza neste caráter (equívoco).

5. DISCUSSÃO

ANATOMIA

O gênero *Pilocarpus* Vahl vem sendo estudado desde o final do século XIX sob o ponto de vista taxonômico e principalmente anatômico, podendo-se citar trabalhos de Meyer (1892, *apud* Kaastra 1982), Duval (1903), Solereder (1908) e Metcalfe e Chalk (1950). Entretanto, de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, o mesmo não ocorre para os demais gêneros presentes neste estudo, sendo poucos os trabalhos desenvolvidos.

Metcalfe & Chalk (1979) realizaram uma ampla revisão sobre anatomia de Dicotiledôneas, abordando diferentes aspectos, dentre eles a ornamentação da cutícula. Neste trabalho, os autores descrevem que a ornamentação cuticular é um importante caráter diagnóstico para separar espécies, citando alguns exemplos em Anacardiaceae, Ericaceae e Sapotaceae. Em Rutaceae, Duval (1903) observou que esse caráter é freqüente para *Pilocarpus*. No entanto, dentre as espécies estudadas, o autor não menciona o tipo de ornamentação cuticular em *P. microphyllus* e *P. spicatus*. Já Spegazzini *et al.* (2002), mencionam a ocorrência da cutícula estriada, em ambas as faces da epiderme, para *P. jaborandi* e *P. microphyllus*, corroborando os resultados obtidos por Duval (1903) e Kaastra (1982) em relação à *P. jaborandi*. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, apenas *Raulinoa echinata* não apresentou cutícula estriada. Além disso, nem sempre as estrias são desenvolvidas de um mesmo modo nas duas faces da folha (Solereder 1908). Isso ocorre com *P. pauciflorus* e *Balfourodendro riedelianum* onde só a face abaxial é lisa; e em *Galipea trifoliata* onde a adaxial é lisa. Como exemplo de trabalhos que utilizam a ornamentação da

cutícula na separação de espécies, cita-se o de Rocha & Neves (2000) sobre anatomia foliar de duas espécies de *Hibiscus* (Malvaceae), sugerindo que tal caráter pode ser utilizado para separar *H. tiliaceus* (cutícula estriada) de *H. pernambucensis* (cutícula lisa). No presente estudo, este caráter não parece ser informativo na delimitação das espécies.

Quanto aos tricomas, Metcalfe & Chalk (1950) citam que tectores e glandulares podem ocorrer em Rutaceae, embora este caráter não seja freqüente em muitos membros da família. Nas espécies estudadas, no presente trabalho, foi observado que pelo menos um, dos dois tipos registrados na família, ocorre na lâmina foliar. Com relação ao pecíolo, apenas duas espécies (*Esenbeckia leiocarpa* e *Helietta apiculata*) apresentam tricoma glandular, situação inversa no tipo tector onde *P. pauciflorus* e *P. giganteus* são as únicas que não apresentam esse tipo de tricoma. Em uma abordagem geral da distribuição dos tipos de tricomas, foi observada uma maior concentração de tricomas glandulares na lâmina foliar do que no pecíolo. Por exemplo, o tricoma glandular na folha ocorreu em todas as espécies estudadas, enquanto que no pecíolo, somente duas espécies apresentaram tal caráter.

Com relação aos tricomas tectores, o tipo unicelular foi evidenciado por vários autores para *Pilocarpus* (Duval 1903; Kaastra 1982; Skorupa 1996; Gallardo & Jiménez 2002; Spegazzini *et al.* 2002). Neste trabalho somente *R. echinata* não apresentou tricomas tectores unicelulares, enquanto que nas demais espécies, este tricoma foi observado em ambas as faces da epiderme foliar.

Os tricomas secretores em Rutaceae são descritos por Kaastra (1982) como glândulas externas cuja região apical é globular multicelular. Para fins de terminologia, no presente estudo, foram considerados sinônimos tricomas glandulares e tricomas secretores. Além disso, Gallardo & Jiménez (2002) também descrevem a presença de glândulas externas multicelulares na região abaxial de *P. goudotianus* (= *P. racemosus* subsp. *Goudotianus*). Entretanto, segundo Fahn (1974), o termo tricoma designa todos os apêndices unicelular e multicelular da epiderme. Portanto, observando a figura da glândula externa mencionada por Gallardo & Jiménez (2002) e comparando-a com a terminologia de Fahn (1974) pode-se inferir que a glândula externa multicelular trata-se de um tricoma glandular multicelular.

Dentre as espécies analisadas, foram observados dois tipos de tricomas glandulares (capitado e peltado), ambos sendo multicelulares e ocorrendo nas faces adaxial e abaxial. Além disso, sete das doze espécies estudadas apresentam o tricoma capitado e somente *H. apiculata* apresenta os dois tricomas na mesma lâmina foliar.

Quanto aos trabalhos com *Pilocarpus*, alguns autores (Duval 1903; Gallardo & Jiménez 2002; Spegazzini *et al.* 2002) descreveram a ocorrência de tricomas glandulares em

ambas as faces da epiderme, no entanto, não classificaram o tipo observado. Geiger (1897, *apud* Kaastra 1982) ressaltou que os tricomas glandulares estão presentes em todas as espécies de *Pilocarpus*, mas são raros em *P. spicatus* e *P. microphyllus*. Kaastra (1982) concorda com esta observação feita por Geiger (loc.cit) e acrescenta que estas espécies não possuem o tricoma em depressão, e que por este motivo freqüentemente estão quebrados. Já Spegazzini *et al.* (2002) mencionam a ocorrência dos tricomas em depressão bem como a região apical constituída por 2 células em *P. microphyllus*. No entanto, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho para *P. microphyllus*, observa-se que estes tricomas são escassos e não ocorrem em depressão e que a região apical do tricoma é unicelular, e não multicelular como mencionado por Spegazzini *et al.* (loc.cit.).

Quanto ao número de camadas de células epidérmicas na folha, a epiderme é unisseriada, em ambas as faces, sendo observada para todos os indivíduos analisados, incluindo as espécies de *Pilocarpus*, corroborando os dados de Marquete (1981), Spegazzini *et al.* (2002) e Gallardo & Jiménez (2002). O mesmo foi observado no pecíolo, semelhante ao descrito por Marquete (loc.cit.).

Segundo Metcalfe & Chalk (1979), as paredes anticlinais das células epidérmicas podem ser retas, curvadas ou onduladas. Ao tratar das paredes anticlinais da epiderme em vista frontal, Duval (1903) observou que as espécies de *Pilocarpus* com folhas simples geralmente possuem paredes retilíneas e as de folhas compostas, paredes onduladas. Entretanto, o autor não mencionou se ambas as faces da epiderme possuem esta característica. Spegazzini *et al.* (2002) também descreveram tais características em três espécies de *Pilocarpus* com folhas compostas, observando que, em pelo menos umas das faces, possuem paredes retas a levemente onduladas. Neste trabalho, espécies de *Pilocarpus*, tanto de folhas simples quanto compostas, foram analisadas e verificou-se que na face abaxial, independente dos padrões foliares, todas as espécies possuem paredes retas. Além disso, na face adaxial, *P. spicatus* (folhas simples) apresentou paredes sinuosas. Portanto, com o aumento de espécies analisadas, percebe-se que a relação proposta por Duval (1903) não se aplica ao gênero *Pilocarpus*. Quanto aos resultados descritos por Spegazzini *et al.* (2002) a terminologia referente a parede “reta a levemente ondulada” é muito subjetiva. Além disso, comparando as fotos da epiderme em vista frontal das espécies mencionadas no trabalho de Spegazzini *et al.* (2002), com as analisadas neste estudo, observa-se que ambos os resultados foram iguais, sendo utilizados terminologias diferentes para a mesma característica. Ou seja, seguindo os parâmetros utilizados neste trabalho, as espécies *P. jaborandi* e *P. microphyllus* apresentam paredes retas e não “reta a levemente ondulada”.

Haberlandt (1928, *apud* Rocha & Neves 2000) atribui à sinuosidade das paredes importante função mecânica, aumentando a rigidez da célula para prevenir o colapso parietal no caso de escassez de água. Esau (1985), em seu livro sobre anatomia vegetal, relata a ocorrência de células epidérmicas com paredes sinuosas como decorrência das condições ambientais como luz e umidade. Fahn & Cutler (1992) estudaram as adaptações morfológicas e anatômicas em espécies que vivem em ambiente xérico, e constataram que geralmente as paredes anticlinais, em vista frontal, de algumas xerófitas são retas, entretanto em secção transversal estas podem ser muito sinuosas. Rocha & Neves (2000) observaram que a parede anticlinal poderia ser usada como um caráter diagnóstico para separar duas espécies de *Hibiscus* (Malvaceae), uma vez que estas foram coletadas em um mesmo local, ou seja, sob as mesmas condições ambientais, entretanto, uma das espécies apresentava uma maior sinuosidade da parede. Com relação aos resultados obtidos no presente estudo, observou-se que todas as espécies coletadas na floresta ombrófila densa (*Galipea trifoliata*, *Metrodorea flavida* e *Pilocarpus alatus*), possuem pelo menos uma das faces da epiderme com paredes sinuosas em vista frontal. Assim, a colocação de Haberlandt (1928, *apud* Rocha & Neves 2000) não pode ser considerada neste trabalho, já que na floresta ombrófila densa, provavelmente, não há escassez de água, além de não possuírem as características mencionadas por Fahn & Cutler (1992) para xerófitas.

Quanto às colocações de Esau (1985) e Rocha & Neves (2000), são mais interessantes para serem discutidas. Esau (1985) atribuiu à sinuosidade da parede em decorrência de fatores ambientais como umidade e luz. No presente estudo, foram coletadas três espécies da floresta ombrófila densa (*G. trifoliata*, *M. flavida* e *P. alatus*) e uma espécie em mata de galeria (*P. spicatus*), cujas possuem a sinuosidade da parede. Considerando que as condições ambientais desses dois perfis vegetacionais são parecidas, provavelmente, as taxas de umidades e de luminosidade sejam semelhantes. Deste modo, nota-se que tal caráter aparece em espécies, as quais estão submetidas a similares taxas de umidade e luz, corroborando a proposta de Esau (1985). No entanto, não foi possível comparar se duas espécies do mesmo gênero, sob as mesmas condições ambientais, apresentam alguma diferença nas paredes anticlinais, como Rocha & Neves (2000) observaram com as espécies de *Hibiscus*, sendo, portanto, prematuro afirmar se este caráter é diagnóstico ou adaptativo para *Pilocarpus* e gêneros relacionados.

Outros caracteres ainda relacionado a epiderme são os tipos e a distribuição dos estômatos. Segundo Dickson (2000), a diversidade de tipos de estômatos oferece um dos mais importantes caracteres observados na epiderme. O autor ressalta que o tipo de estômato é usado como caráter chave na circunscrição do maior grupo de monocotiledônea. Fahn

(1974) também menciona que a estrutura do complexo estomático pode ser utilizada em estudos taxonômicos. Além disso, Dickison (2000) acrescenta que a classificação dos tipos de estômatos desenvolvidos tem sido muito utilizada e que a maior parte dos grupos taxonômicos pode ser caracterizada por apresentarem um padrão, ou a combinação de dois ou mais padrões.

Adicionalmente, trabalhos com anatomia ecológica relacionam a posição dos estômatos dentre as células epidérmicas com as condições ambientais que a planta está submetida. Por exemplo, Fahn & Cutler (1992) mencionam que estômatos em depressões ou criptas são característicos de xerófitas. Ainda segundo os autores, outras características como densidade estomática, presença de cutícula nas células-guarda e subsidiárias e, ocorrência de estômatos em ambas as faces da epiderme, também são utilizados como caracteres adaptativos.

De acordo com Metcalfe & Chalk (1950), os estômatos, em Rutaceae, geralmente estão situados na face abaxial na maioria das espécies, e que as células subsidiárias aparecem com diferentes arranjos entre os membros da família. Neste estudo, todas as espécies de *Pilocarpus* e gêneros relacionados são hipostomáticas, com os estômatos ao mesmo nível das células epidérmicas, característica citada, para *Pilocarpus*, por vários autores como, Duval (1903), Marquete (1981), Spegazzini *et al.* (2002), Gallardo & Jiménez (2002). Assim, confrontando os resultados acima, com a descrição sobre estômatos que Fahn & Cutler (1992) fazem para xerófitas, pode-se inferir que tais espécies não apresentam características xeromórficas.

Quanto aos tipos de estômatos observados em *Pilocarpus*, Duval (1903) menciona a ocorrência de estômatos com 4-5 células subsidiárias sendo comuns nas espécies estudadas. Skorupa (1996) fez uma revisão taxonômica para este gênero e observou três tipos de estômatos: anomocítico (*P. spicatus*), tetracíticos comuns e estômatos com 4 células subsidiárias, sendo duas oblíquas na porção superior e duas na porção inferior. Além disso, o autor menciona a ocorrência de estômatos com 4-5 células subsidiárias sendo comuns nas espécies estudadas, corroborando as observações de Duval (1903). Estômatos tetracíticos também foram observados em *P. goudotianus* (= *P. racemosus* Vahl subsp. *goudotianus* Tul.) por Gallardo & Jiménez (2002). Marquete (1981) observou estômatos do tipo anomocítico, anisocítico e tetracítico em *P. organensis* (= *P. pauciflorus*). Já Spegazzini *et al.* (2002) mencionam a ocorrência de estômatos do tipo ciclocíticos em *P. jaborandi*, *P. microphyllus* e *P. pennatifolius*. Todas as espécies de *Pilocarpus* analisadas neste trabalho apresentaram predominantemente na lâmina foliar, estômatos tetracíticos, corroborando os dados de

Skorupa (1996). Estômatos com 4-5 células subsidiárias também foram observados concordando com Duval (1903) e Skorupa (1996). Entretanto, Skorupa (1996) observou estômatos anomocíticos para *P. spicatus*, diferente com o que descrito para tal espécie no presente estudo. Para os gêneros relacionados, a maioria apresentou estômatos anomocíticos, exceto *R. echinata*, cujo o padrão foi o mesmo observado para *Pilocarpus*.

Neste presente estudo, além de terem sido analisados os tipos de tricomas, a ornamentação da cutícula, as paredes anticlinais da epiderme da folha e os tipos de estômatos, outras características relativas à epiderme também foram observadas. Uma delas é a relação do tamanho entre células epidérmicas, em secção transversal, da face adaxial x abaxial da lâmina foliar. A análise deste caráter é inédita para *Pilocarpus*, sendo que a maior parte das espécies analisadas apresenta as células da face adaxial e abaxial do mesmo tamanho. Possivelmente, este caráter não está relacionado ao ambiente, pois três espécies, que ocorrem no mesmo ambiente (floresta ombrófila), sob as mesmas condições de luminosidade, umidade e água, apresentaram características diferentes.

Outro registro importante para este estudo foi que, em secção transversal do mesofilo de *Helietta apiculata*, células epidérmicas de ambas as faces se dividem periclinalmente de forma irregular. Da literatura disponível até o momento sobre anatomia foliar de Rutaceae não foi registrada a ocorrência deste caráter na família. Situação semelhante é descrita para Asteraceae, onde Melo-de-Pinna *et al.* (em prep.), no estudo sobre anatomia foliar de xerófitas, verificaram que *Eremathus* sp. também apresentaram divisão periclinal de algumas células epidérmicas na face adaxial. É interessante observar, que ambas as espécies descritas acima, esta divisão periclinal da epiderme ocorre somente em algumas células, não podendo ser caracterizada como epiderme multisseriada. Diante disso, é difícil entender o porquê da epiderme possuir esta característica, uma vez que não há trabalhos feitos sobre tal caráter.

De acordo com Fahn (1974), em algumas folhas e pétalas, a parede periclinal externa das células epidérmicas é papilosa. Segundo Haberlandt (1918 *apud* Fahn 1974), estas estruturas têm a função de concentrar a luz nas plantas que crescem na sombra. Adicionalmente, Metcalfe & Chalk (1979) mencionam que a epiderme papilosa é geralmente um caráter diagnóstico por sua localização ou pela aparência. Duval (1903) menciona a ocorrência de papilas na face abaxial em *P. giganteus*, *P. pennatifolius* e *P. trachylophus*. Metcalfe & Chalk (1950) também registram estas células para alguns gêneros de Rutaceae, incluindo *Pilocarpus*. No entanto, na lâmina foliar, nenhuma das espécies analisadas, no presente estudo, apresentou esta característica. Já no pecíolo, a presença de epiderme papilosa em *P. spicatus*, *Esenbeckia leiocarpa* e *H. apiculata* foram observados, mas nenhum dos

autores mencionados acima relata a ocorrência de papilas no pecíolo. Possivelmente, a definição funcional da epiderme papilosa, mencionada por Haberlandt (loc. cit.), não se aplicaria, nesta situação, para o pecíolo. É importante ressaltar que *H. apiculata* e *E. leiocarpa* são espécies cultivadas que foram coletadas na ESALQ (Escola Agrícola Luiz de Queiroz – Piracicaba/SP) e ambas não estavam num ambiente sombreado.

Quanto à presença de hipoderme, Metcalfe & Chalk (1950) mencionam que alguns membros de Rutaceae, incluindo *Pilocarpus* podem apresentar uma ou mais camadas. Kaastra (1982), em sua monografia da flora neotropical, citou algumas espécies (*P. giganteus*, *P. jaborandi*, *P. racemosus* e *P. spicatus*) onde alguns autores já haviam registrado tal característica. Entretanto, nenhuma espécie estudada neste trabalho apresentou hipoderme característica conforme descrição dos autores.

Alguns caracteres encontrados no mesofilo como: o número de camadas e a forma do parênquima paliçádico; presença de estruturas secretoras e idioblastos cristalíferos; também foram descritos no presente estudo.

A estrutura dorsiventral (bifacial) foi evidenciada em todas as espécies de *Pilocarpus* e gêneros relacionados corroborando os dados de Duval (1903), Marquete (1981), Guallardo & Jiménez (2002) e Spegazzini *et al.* (2002). Além disso, somente *Helietta apiculata* apresentou parênquima paliçádico biestratificado, enquanto que nas demais espécies, é uniestratificado. Duval (1903) tentou relacionar o número de camadas com o padrão foliar (folha simples ou composta), ou seja, o parênquima paliçádico apresentou duas camadas nas espécies de folhas simples e uma ou duas camadas nas espécies de folhas compostas. Marquete (1981) e Spegazzini *et al.* (2002) analisaram apenas folhas compostas, descrevendo uma única camada de parênquima paliçádico, corroborando o padrão proposto por Duval (loc. cit.). Entretanto, este padrão não foi observado nas espécies estudadas, no presente trabalho, incluindo folhas simples e compostas de *Pilocarpus*, pois nas folhas simples foi descrita uma única camada de parênquima paliçádico, caráter que segundo Metcalfe & Chalk (1950) é comum em *Pilocarpus*. Adicionalmente, Guallardo & Jiménez (2002), mencionam que o parênquima paliçádico biestratificado é um caráter xeromórfico em *P. goudotianus* (= *P. racemosus* Vahl subsp. *goudotianus* Tul.).

O formato das células do parênquima paliçádico em *Galipea trifoliata*, é retangular, enquanto que nas demais espécies, tende a ser mais cilíndrico (paliçada). Essa característica não foi registrada por nenhum dos autores acima mencionado. Sabe-se que o arranjo das células do parênquima paliçádico maximiza a eficiência da fotossíntese pelo posicionamento das células em um ótimo ângulo para a chegada dos raios solares (Dickison 2000). A espécie

que possui tal característica foi coletada numa floresta ombrófila densa, onde, possivelmente a taxa de luminosidade é baixa. Entretanto, duas espécies (*Pilocarpus alatus* e *Metrodorea flavida*) que foram coletadas nesse tipo de vegetação não apresentam células do parênquima paliçádico retangular. Diante disso, seria interessante analisar outras espécies de *Galipea*, para tentar descobrir se este formato de célula está relacionado com alguma adaptação da planta ao ambiente ou se é um caráter diagnóstico.

Outra característica interessante referente ao parênquima paliçádico das espécies estudadas é a presença de cristais em “compartimentos”. A única espécie que não tem cristais nesta região é a mesma que apresentou o parênquima paliçádico com o formato retangular (*Galipea trifoliata*). No entanto, *G. trifoliata* possui ráfides no parênquima lacunoso e na região da nervura mediana. Além disso, todas as espécies de *Pilocarpus* apresentam drusas de oxalato de cálcio em “compartimentos” no parênquima paliçádico, enquanto que nas demais, são observados cristais em forma de bastonetes. Duval (1905 *apud* Kaastra 1982) foi um dos primeiros pesquisadores a observar a ocorrência de células septadas transversalmente com drusas de oxalato de cálcio em cada compartimento, como traço característico de quase todas as espécies de *Pilocarpus*. Esta característica também foi mencionada por Metcalfe & Chalk (1950), Marquete (1981) e Spegazzini *et al.* (2002).

No entanto, o termo “células septadas” do parênquima paliçádico, mencionado por alguns autores citados acima, poderia ser melhor discutido. Por exemplo, a maioria das hifas dos fungos pode estar dividida por paredes transversais chamadas septos, onde tais hifas são ditas septadas. No caso dos fungos, os septos são perfurados por um poro central, ou seja, o protoplastos das células adjacentes está em continuidade com as células vizinhas (Raven *et al.* 2001). Esta descrição sobre septos para fungos é corroborada com a definição proposta por Font Quer (1979), onde septo seria uma estrutura constantemente perfurada, que divide incompletamente uma cavidade celular. Outro exemplo, mas agora em plantas vasculares, seria sobre a fibra septada. Segundo Esau (1974), as fibras podem desenvolver paredes transversais delgadas (septos) depois da formação das paredes secundárias, passando a ser denominadas de fibras septadas, ou seja, estes septos seriam paredes divisórias contínuas, sem a presença de um poro como nos fungos. Em relação ao termo septado, Hickey & King (2000) o definem como dividido em compartimentos por paredes ou partições, corroborando a idéia para as fibras septadas. No caso destas divisões presentes no parênquima paliçádico descrito neste estudo, cada compartimento possui sua própria parede periclinal contínua, ou seja, não são perfuradas, como nos fungos, e nem delgadas, como nas fibras. Por esta razão, mesmo sabendo que a definição de septado proposta por Hickey & King (2000) se aplicaria

parcialmente na descrição das “células septadas” do parênquima paliçádico mencionado por Duval (1905 *apud* Kaastra 1982), nota-se que a definição ainda é vaga, pois não diz o número de paredes transversais que o septo pode possuir. Provavelmente, o septo seja formado por uma parede transversal delgada, como ocorre nas fibras septadas, situação essa que não se aplica ao parênquima paliçádico descrito no presente estudo, pois este possui duas paredes, como um possível resultado de divisão celular. Assim, a terminologia sugerida no presente trabalho foi “compartimento” do parênquima paliçádico ao invés do termo “células septadas” do parênquima paliçádico como mencionado por Duval (1905 *apud* Kaastra 1982) e outros autores. Ressalta-se a necessidade de um estudo ultraestrutural e ontogenético para que novas informações sejam geradas.

Quanto ao parênquima lacunoso, apresenta um número variado de camadas (5-13), no entanto, todas as espécies estudadas apresentam células braciiformes, formando espaços intercelulares. Para *Pilocarpus*, Metcalfe & Chalk (1950) e Marquete (1981) também mencionam a formação de grandes lacunas neste tecido, contudo, nenhum destes autores descreve o contorno das células como braciiforme.

Ainda no mesofilo, todas as espécies do presente trabalho, apresentam alguma estrutura secretora (células e/ou cavidades). A característica mais marcante em Rutaceae é a presença de pontoações translúcidas nas folhas, que correspondem a cavidades glandulares multicelulares produtoras de óleos essenciais aromáticos, típicos da família (Solereder 1908 ; Metcalfe & Chalk 1950, Cronquist 1981). A única espécie, deste trabalho, que não apresentou cavidades secretoras logo interno à epiderme foi *Esenbeckia leiocarpa*. Esta espécie possui somente células secretoras ao invés de cavidades, mas esta condição já foi mencionada por Metcalfe & Chalk (1950), no qual as cavidades podem ser substituídas por células secretoras isoladas ou acompanhadas por tais células. Duval (1903) cita a ocorrência das cavidades secretoras no mesofilo das folhas, próximo à epiderme (cavidades subepidérmicas) em espécies de *Pilocarpus*. Tal situação foi descrita também por Kaastra (1982), para algumas espécies de *Pilocarpus* e *Metrodorea* e corrobora com os resultados apresentados aqui.

Segundo Esau (1974), as cavidades diferem das células secretoras pelo fato de serem resultados de dissolução de células (lisígena), de sua separação (esquizógena) ou de ambos os processos (esquizo-lisígena). Quanto à origem dessas cavidades em Rutaceae foram referidas como: esquizógena por Solereder (1908); lisígena ou esquizo-lisígena por Engler (1931); esquizógena ou lisígena por Metcalfe & Chalk (1950). Observa-se que não há um consenso entre os autores acima mencionados sobre a origem das cavidades, uma vez que não há um padrão de desenvolvimento das cavidades entre as espécies de Rutaceae. A melhor forma de

identificar a origem da cavidade de dada espécie é fazendo o estudo de desenvolvimento dessa estrutura. Por exemplo, o gênero *Citrus* sempre foi descrito possuindo cavidades secretoras lisígenas (Metcalf & Chalk 1950; Esau 1974). No entanto, no trabalho feito por Bennici & Tani (2004), sobre a anatomia e ultraestrutura do desenvolvimento da cavidade secretora em *Citrus sinensis* e *Citrus limon*, eles observaram que estas espécies possuem cavidade de origem esquizo-lisígena. Para *Pilocarpus*, as cavidades secretoras seriam esquizógenas segundo os dados de Marquete (1981) e esquizo-lisígena para Spegazzini *et al.* (2002), definições sugeridas sem um estudo ontogenético. Com as espécies contidas no presente trabalho está sendo feito um estudo sobre desenvolvimento foliar (Muntoreanu & Melo-de-Pinna, em prep.), e nos resultados preliminares foi possível observar que em *Pilocarpus*, e nos demais gêneros as cavidades são esquizo-lisígena.

Na nervura principal da folha, foram observados o contorno e a unidade vascular (*sensu* Menezes *et al.* 2003). Quanto ao contorno da nervura, este não foi utilizado como caráter. Por exemplo, em *P. jaborandi*, na base foliar o contorno é biconvexo, enquanto que no meio e no ápice é plano-convexo. Além disso, Duval (1903) descreveu o contorno de *P. microphyllus* como biconvexo, e no presente estudo, observou-se o padrão convexo-plano em toda a lâmina foliar. No entanto, alguns trabalhos utilizam este caráter (contorno da nervura principal) para delimitação taxonômica. Um exemplo, seria o trabalho de Bieras & Sajo (2004), no estudo da anatomia foliar de espécies de *Erythroxylum* (Erythroxylaceae), onde os autores montaram uma chave de identificação dos referidos táxons utilizando este caráter. Porém, neste trabalho com *Erythroxylum*, os autores padronizaram a região analisada (mediana do limbo), comparando-a entre os táxons para a confecção da chave de identificação. Mas, para um trabalho com sentido mais filogenético, não seria viável utilizar um caráter que não possui um estado constante na região em que foi observado.

No pecíolo, o contorno e o tipo do sistema vascular não foram utilizados como caráter pelo mesmo motivo da folha acima discutido. Marquete (1981) estudou a anatomia do pecíolo de uma espécie de *Pilocarpus*, e descreveu que na região basal do pecíolo foram observados 3 feixes vasculares (um maior central e dois laterais menores) e que até a região apical, estes feixes se unem formando um só. Além disso, o autor menciona a ocorrência de numerosos idioblastos cristalíferos e presença de epiderme uniestratificada. Todos os dados descritos por Marquete (1981) corroboram o que foi observado para as espécies do presente estudo, talvez representando um padrão de desenvolvimento do sistema vascular no pecíolo.

Segundo Geiger (1897 *apud* Kaastra 1982), unidade vascular da nervura mediana de *Pilocarpus* é colateral e circundada por um anel de esclerênquima, o que foi confirmado com as espécies estudadas, tendo essas células esclerenquimáticas origem pericíclica.

Domácias em cripta foram registradas em *Balfourodendron riedelianum* no presente estudo. O termo Domácia é, geralmente, aplicado a tufos de tricomas, depressões, bolsos ou sacos presentes nas axilas das nervuras de maior calibre, quando ocorrem exclusivamente na face inferior das folhas (Wilkinson 1979). Vários autores consideram que há uma relação restrita entre domácias e animais, principalmente ácaros e formigas. Solís (1997) estudou a anatomia de domácias foliares em três espécies de Rutaceae, registrando a ocorrência de domácias em cripta para a espécie de *B. riedelianum*.

Quanto aos estudos sobre arquitetura foliar, Hickey & Wolfe (1975) demonstraram que as características da organização foliar são indicadores significativos para estudos taxonômicos e das relações filogenéticas dentro das dicotiledôneas. Por exemplo, Reis *et al.* (2004) estudaram a venação foliar de 22 espécies de Melastomataceae e concluíram que alguns caracteres desse estudo (tipo de aréola, tipo de venação última marginal, entre outras) podem ser úteis na delimitação de tribos e gêneros.

Dentre as espécies de *Pilocarpus*, o padrão de venação do tipo broquidódroma ocorre em todos os táxons (Skorupa 1996). O autor ainda menciona que *P. giganteus* e *P. spicatus* possuem uma tendência ao padrão eucamptódromo. Marquete (1981), também observou tal padrão para uma espécie de *Pilocarpus*. Neste trabalho, todas as espécies (*Pilocarpus* e demais gêneros) possuem padrão broquidódroma. Quanto as terminações de nervuras, Skorupa (loc. Cit.) menciona os tipos simples ou ramificados (1 ou 2 vezes), corroborando os dados do presente estudo. Em relação ao desenvolvimento das aréolas, os dados de Skorupa (loc. Cit.) mostram-se dos tipos incompletos e imperfeitos. Esta classificação também foi encontrada entre as espécies do presente estudo.

MAPEAMENTO DOS CARACTERES

A matriz morfológica do grupo *Pilocarpus* (e gêneros relacionados) ainda não está disponível na literatura, o que impossibilitou testar os caracteres, levantados neste trabalho, na filogenia do grupo. Diante disso, fez-se então uma análise preliminar destes caracteres, através do mapeamento utilizando o programa MacClade 4.0.

Nesta análise preliminar, não foi possível afirmar quais são os caracteres filogeneticamente informativos. Apesar disso, o mapeamento permitiu observar a tendência

de alguns caracteres serem informativos para determinados terminais, ou até mesmo para o grupo *Pilocarpus*, propondo suas possíveis relações filogenéticas.

Nos resultados apresentados no presente estudo, as árvores mapeadas foram agrupadas de acordo com o número de caracteres que alguns terminais apresentaram em comum. Por exemplo, *Raulinoa echinata* e *Helietta apiculata* foram os terminais que apresentaram um maior número de caracteres em comum. No entanto, não é possível saber se alguns destes caracteres relacionados indicariam alguma sinapomorfia para estes representantes ou se seriam apenas caracteres homoplásticos.

Dos 32 caracteres mapeados, 8 possivelmente não sejam tão informativos se forem utilizados na análise cladística do grupo de *Pilocarpus*, uma vez que possam indicar autapomorfias. Dentre os terminais analisados, *Esenbeckia leiocarpa* foi o que apresentou um maior número de caracteres divergindo dos demais representantes (por exemplo, caracteres 4, 12, 18, 27 e 28). Em *Galipea trifoliata* também foi observada tal situação.

Com relação às espécies de *Pilocarpus*, a presença de drusas de oxalato de cálcio no parênquima paliçádico (caráter 14) e no pecíolo (caráter 31) indica uma possível sinapomorfia para este grupo, podendo ser caracteres úteis para solucionar a tricotomia basal formada por *P. microphyllus* + o clado formado por *P. pauciflorus* + o clado formado por *P. trifoliolatus*, mostrada na filogenia proposta por *Dias* e colaboradores.

Ainda sobre a tricotomia formada no clado de *Pilocarpus*, alguns caracteres podem ser importantes para tentar resolver tal problema. Por exemplo, o caráter tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar (caráter 4) parece ser homoplástico e o estado pedúnculo unicelular com região apical unicelular tende a ser uma sinapomorfia para *P. microphyllus* e o clado formado por *P. pauciflorus*. Já o caráter tricomas glandulares peltados na lâmina foliar (caráter 5) também tende a ser homoplástico e o estado presente pode indicar uma sinapomorfia para o clado formado *P. trifoliolatus* a *P. racemosus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo morfo-anatômico foliar das espécies de *Pilocarpus* revelaram a presença de características comuns tais como:

- tricomas tectores unicelulares e tricomas glandulares na lâmina foliar;
- folhas hipostomáticas;
- cavidades secretoras subepidérmicas;
- mesofilo dorsiventral com 1 camada de parênquima paliçádico;
- drusas de oxalato de cálcio em “compartimentos” no parênquima paliçádico;
- unidade vascular central do tipo colateral;
- padrão de nervação foliar do tipo camptódromo-broquidódromo;
- presença de três cilindros vasculares livres na região basal do pecíolo, que se funde em um nível mais elevado.

Algumas das características acima mencionadas também foram observadas nas demais espécies dos gêneros relacionados à *Pilocarpus*. Além disso, tais características se mostraram importantes à caracterização geral das espécies.

Diante disso, pode-se concluir que os aspectos mais importantes abordados no presente estudo foram:

- Ø Contribuir com o conhecimento anatômico foliar de gêneros de Rutaceae neotropicais, trazendo dados inéditos para a literatura;
- Ø Identificar uma possível sinapomorfia para o grupo *Pilocarpus*, que seria a presença de drusas de oxalato de cálcio em “compartimentos” no parênquima paliçádico;
- Ø Sugerir a inclusão dos caracteres morfo-anatômicos foliares em novas análises cladísticas em *Pilocarpus*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adobe Systems Incorporated. 2002. **Photoshop 6.0**. Todos os direitos reservados.
- Aliscioni, S. S. 2002. Contribución a la filogenía del género *Paspalum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 89:504–523.
- Bennici, A; Tani, C. 2004. Anatomical and ultra structural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: Evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora* 199, 464– 475.
- Bieras, A. C.; Sajo, M.G. 2004. Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (*Erythroxylaceae*) do Cerrado do estado de São Paulo, Brasil; *Acta Botanica Brasilica*, v. 18, n. 3, (601- 612).
- Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos*, v. 61, n. 8, p. 255.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press, 1981. 1262p.
- Cronquist, A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants second edition. The New York Botanical Garden, New York. 555 pp.
- Dahlgren, 1980. R.M.T., A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* (London).
- Dias, P., Udulutsch, R.G. & Pirani, J.R. submetido. Phylogeny of *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) and stochastic mapping of characters. *Syst. Biol.*
- Dickison, W.C. 2000. Integrative Plant Anatomy, Harcourt/Academic Press, San Diego.
- Duval, A. 1903. “Les jaborandis”. *Bull. Sci. Pharm.* 5: 41-109.
- Engler A. 1874. Rutaceae. In: C. F. P. Martius & A. G. Eichler. *Flora brasiliensis*. Vol. 12 (2). Munich.
- Engler, A. 1986. Anacardiaceae: Anatomisches Verhalten. Leipzig: Die Natürlichen Pflanzenfamilien Bd. p. 139-140.
- Engler, A. 1931. Rutaceae. In: Engler, A.; Prantl, K. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. 2. ed. Leipzig.
- Esau, K. 1974. Anatomia de plantas com sementes. São Paulo: Edgard Blücher.
- Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. 3ª ed. Omega, Barcelona.

- Fahn, A. 1974. Plant Anatomy. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn, A. & Cutler, D. 1992. Xerophytes. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- Franklin, G. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood - resin composites and a new macerating method for wood. *Nature* 155(39): 51.
- Font Quer, P. 1979. Diccionario de Botanica. Madrid: Labor.
- Gadek, P. A.; Fernando, E.S.; Quinn, C.J.; Hoot, S.B.; Terrazas, T.; Sheahan, M.C.; Chase, M.W. 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany* 83, pp. 802–811.
- Gallardo, L.H. & Jiménez, M.E. 2002. Anatomía foliar de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). *Caldasia* 24: 269-275.
- Groppo Jr., M. 2004. Filogenia de Rutaceae e revisão taxonômica de Hortia Vand. (Rutaceae). Universidade de São Paulo, São Paulo. (Tese de Doutorado).
- Heywood, V.H. 1993. Flowering plants of the world. B T Bastford Ltd. London.
- Hickey, L. J. & Wolfe, J. A. 1975. The bases of Angiosperm phylogeny: Vegetative morphology. *Ann. Missouri Bot. Garden* 62: 538-589.
- Hickey, L. J. 1979. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Metcalfe, C. R. & Chalk, L. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. 2. ed. Oxford: Clarendon. p. 25-39.
- Hickey M, King C. 2000. The Cambridge illustrated glossary of botanical terms.. Cambridge: Cambridge University Press. 208 pp.
- Johansen, D. A. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw - Hill Book Co. Inc., New York.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. & Donoghue M. J. 2002. Plant systematics: a Phylogenetic approach, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Kaastra, R.C. 1982. Pilocarpinae (Rutaceae). *Flora Neotropica Monograph* 33. The New York Botanical Garden, New York.
- Kraus, J.E., Sousa, H.C., Rezende, M.H., Castro, N.M., Vecchi, C. & Luque, R. 1998. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. *Biotechnic & Histochemistry* 73: 235-243.

- Landrum, J.V. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adaptation to xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon*, 51(3), 463-473.
- Leaf Architecture Working Group (LAWG). 1999. Manual of leaf architecture – morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms, Washington, DC, Smithsonian Institution.
- Liu, W. & Hu, Z. 1998. Comparative anatomy of secretory cavities in leaves of the Rutaceae in China. *Acta Phytotaxon. Sinica*. 36:117-127.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2004. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*, version 1.05. (<http://mesquiteproject.org>).
- Marquete, O. 1981. Anatomia e vascularização foliar e floral de *Pilocarpus organensis* Occhioni & Rizzini (Rutaceae). *Arq. Jard. Bot. Rio de Janeiro* 25:117-159.
- Mello-Silva, R. de .2005. Morphological analysis, phylogenies and classification in Velloziaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 157-173.
- Menezes, N. L.; Silva, D. C. & Melo-de-Pinna, G. F.2003. Folha. Pp. 301-325. In: B. Appezzato-da-Glória & S. M. Carmello-Guerreiro (eds.). Anatomia vegetal. Editora UFV, Viçosa.
- Metcalf, C. & Chalk, L. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. v.II. Oxford, Clarendon Press.
- Metcalf, C. & Chalk, L. 1979. Anatomy of the Dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, v.1.
- Ogundipe, O.T. 2002. Leaf anatomical studies on eleven species of *Zanthoxylum* Linn. (Rutaceae). *Phytomorphology* 52:103-112
- Pirani, J.R. 1998. A revision of *Helietta* and *Balfourodendron* (Rutaceae, Pteleinae). *Brittonia* 50: 348-380.
- Pirani, J.R. 1999a. Estudos taxonômicos em Rutaceae: revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), análise cladística de Pteleinae, sinopse de Rutaceae no Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo (Tese de Livre Docência).
- Pirani, J.R. 1999b. Two new species of *Esenbeckia* (Rutaceae, Pilocarpinae) from Brazil and Bolivia. *Bot. J. Linn. Soc.* 129: 305-313.
- Pirani, J.R. 2002. Rutaceae. In Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J. & Giulietti, A.M. (eds.)

- Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Vol. 2. HUCITEC/FAPESP, São Paulo, pp. 281-308.
- Pirani, J.R. 2004. Three new species of *Galipea* (Rutaceae, Galipeinae) from Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* 144: 365-373.
- Prance, G. T. 1972. Chrysobalanaceae. *Flora Neotropica*., vol. 9, p. 1-409.
- Purvis, M.J., Collier, D.C. & Walls, D. 1964. *Laboratory techniques in botany*. London, Butterworths.
- Radford, A.E.; Dickison, W.C.; Massey, J.R. & Bell, C.R. 1974. *Vascular Plants Systematics*. New York, Harper & How.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 2001. *Biologia vegetal*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan., 906p.
- Reis, C.; Proença, S.L. & Sajo, M.G. 2004. Vascularização foliar e anatomia do pecíolo de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 18(4): 987-999.
- Rocha, J. F. & Neves, L. J. 2000. Anatomia foliar de *Hibiscus tiliaceus* e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (Malvaceae). *Rodriguésia* 51(78/79): 113-132.
- Ruzin, S.E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, New York.
- Scholz, H. 1964 Reihe Celastrales. In H. Melchior, A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien mit besonderer Berücksichtigung der Nutzpflanzen nebst einer Übersicht über die Florenreiche und Florengebiete der Erde, 2: 289–299. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Germany.
- Skorupa, L.A. 1996. *Revisão taxonômica de Pilocarpus Vahl (Rutaceae)*. Universidade de São Paulo, São Paulo (Tese de Doutorado).
- Silveira, M. (1989). Preparação de amostras biológicas para Microscopia eletrônica de varredura. In: *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica*. São Paulo: USP. V-1, p. 71-79.
- Solederer, H. 1908. *Systematic anatomy of dicotyledons*. Clarendon, Oxford.
- Solís, S. M. 1997. Estudios anatómicos de domacios foliares en tres especies de la familia Rutaceae. *Bonplandia* 9 (3-4): 295-303.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Chase, M.W., Mort, M.E., Albach, T.D., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W.H., Hoot, S.B., Fay, M.F., Axtell, M., Swensen, S.M., Prince, L.M., Kress, W.J.,

- Nixon, K.C., and Farris, J.S. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 133(4): 381-461.
- Spegazzini, E.D; Castro, M. T.; Rossi, J; Carpano, S. M; Nájera, T. N. 2002. micrografía foliar cuali-cuantitativa de las especies de pilocarpus (rutaceae): p. jaborandi holmes, p. microphyllus stapf exwardleworth y p. pennatifolius lem. *Dominguesia* 18 (1).
- Strittmater, C. G. D. 1973. Nueva Técnica de Diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica*, Buenos Aires 15(1):126-129.
- Takhtajan, A.L. 1980. Outline of classification of flowering plants (Magnoliophyta). *The Botanical Review* 46(3): 1-271.
- Takhtajan A. 1996. Diversity and classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
- Wilkinson, H.P. 1979. The plant surface (mainly leaf). In *Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject* (C.R.Metcalf & L. Chalk, eds.). Clarendon Press, Oxford, v.1, p.97-165

Figuras 1-7. Espécies representantes da família Rutaceae. 1-2. *Pilocarpus spicatus*. 3. *Pilocarpus giganteus*. 4. *Galipea trifoliata*. 5. *Metrodorea flavida*. 6-7. *Raulinoa echinata*.

Figuras 8-17. Microscopia de varredura (MEV) da epiderme: detalhe da ornamentação estriada da cutícula. Figuras 8-17: epiderme face adaxial. 8. *Pilocarpus microphyllus*. 9. *Pilocarpus spicatus*. 10. *Metrodora flavida*. 11. *Raulinoa echinata*: ausência da cutícula estriada. Figuras 12-17: epiderme face abaxial. 12. *Esenbeckia leiocarpa*. 13-14. *Galipea trifoliata*: presença e ausência da cutícula estriada (seta), respectivamente. 15-16. *Pilocarpus jaborandi*: padrões diferentes das estrias ao redor do estômato. 17. *Pilocarpus microphyllus*: extensão da cutícula estriada. Barras: 8-9, 17 = 20µm; 10, 12-16 = 10µm; 11 = 5µm.

Figuras 18- 23. Tipos de tricomas na folha. 18. *Esenbeckia leiocarpa*: tricoma tector (Tt) filiforme e tricoma glandular capitado (Tg) em MEV. 19-21. *Galipea trifoliata*: tector (Fig. 19), glandular capitado em vista transversal (Fig. 20) e frontal (Fig. 21). 22-23. *Esenbeckia leiocarpa*: detalhe do tricoma glandular capitado em depressão na epiderme em secção transversal (Fig.22) e MEV (Fig. 23). Barras: 18 = 20µm; 19= 80µm; 20-22 = 40µm; 23 = 10µm.

Figuras 24-32. Tricomas capitados e peltados. 24. *Pilocarpus spicatus*: tricoma capitado, com célula apical unicelular em MEV. 25-26. *Pilocarpus pauciflorus* e *Pilocarpus microphyllus*, respectivamente: tricoma capitado, com célula apical unicelular em secção transversal. 27-28. *Balfourodendron riedelianum*: tricoma com célula apical multicelular em MEV (Fig. 27) e secção transversal (Fig. 28). 29. *Metrodorea flavida*: tricoma peltado em MEV (canto superior direito) e secção transversal. 30. *Helietta apiculata*: tricoma peltado em MEV (canto superior direito) e secção transversal. 31-32. *Raulinoa echinata* em MEV. Barras: 24, 27-28 = 20µm; 25-26, 29, 30 = 40µm; 31-32 = 5µm.

Figuras 33-38. Vista frontal da face adaxial. 33. *Galipea trifoliata*. 34. *Esenbeckia leiocarpa*. 35. *Metrodorea flavida*. 36. *Pilocarpus alatus*. 37. *Pilocarpus jaborandi*. 38. *Pilocarpus microphyllus*. Tricoma tector (Tt) e tricoma glandular (Tg). Barras: 35-38 = 40 μ m; 33-34 = 80 μ m.

Figuras 39-44. Vista frontal da face adaxial. 39. *Pilocarpus pauciflorus*: tricoma glandular (Tg). 40. *Raulinoa echinata*: cavidade subepidérmica (seta). 41. *Helietta apiculata*. 42. *Balfourodendron riedelianum*. 43. *Pilocarpus giganteus*: detalhe do contorno das células da epiderme em MEV no canto superior direito. 44. *Pilocarpus spicatus*. Barras: 39-41 = 80µm; 42-44 = 40µm.

Figuras 45-50. Vista frontal da face abaxial. 45. *Galipea trifoliata*. 46. *Esenbeckia leiocarpa*. 47. *Metrodorea flavida*: detalhe da cavidade secretora subepidérmica (seta). 48. *Pilocarpus alatus*. 49. *Pilocarpus jaborandi*. 50. *Pilocarpus microphyllus*. Tricoma tector (Tt). Barras: 45-50 = 40µm.

Figuras 51-56. Vista frontal da face abaxial. 50. *Pilocarpus pauciflorus*. 51. *Raulinoa echinata*: Tricoma glandular (Tg). 52. *Helietta apiculata*: detalhe do estômato em MEV no canto superior direito. 53. *Balfourodendron riedelianum*: notar estômatos em MEV no canto superior direito. 54. *Pilocarpus giganteus*. 55. *Pilocarpus spicatus*. Barras: 51-53, 55-56 = 40µm; 54 = 160µm.

Figuras 57-62. Secção transversal do mesofilo: Notar epiderme uniestratificada, mesofilo dorsiventral, parênquima lacunoso braciforme, Células coletoras (Cc), estômatos na face abaxial (Es) e estruturas secretoras (setas). 57. *Esenbeckia leiocarpa*, onde se observa tricomas tectores em ambas as faces (Tt). 58. *Metrodorea flavida*. 59. *Galipea trifoliata*. 60. *Raulinoa echinata*. 61. *Pilocarpus pauciflorus*. 62. *Pilocarpus microphyllus*. Barras: 57, 60-62 = 80µm; 58 = 160µm; 59 = 40µm.

Figuras 63-68. Secção transversal do mesofilo: Notar epiderme uniestratificada, mesofilo dorsiventral, parênquima lacunoso braciforme, Células coletoras (Cc), estômatos na face abaxial (Es) e estruturas secretoras (setas). 63. *Pilocarpus alatus*: estômato hipostomático. 64. *Pilocarpus jaborandi*. 65. *Balfourodendron riedelianum*. 66. *Helietta apiculata*: detalhe da epiderme se dividindo periclinalmente (seta) no canto superior direito. 67. *Pilocarpus giganteus*. 68. *Pilocarpus spicatus*. Barras: 63-65 = 80µm; 66, 68 = 200µm; 67 = 160µm.

Figuras 69-75. Secção transversal do mesofilo: Detalhe da estrutura secretora. 69. *Esenbeckia leiocarpa*: célula secretora (CS). 70. *Galipea trifoliata*. 71. *Raulinoa echinata*. 72. *Helietta apiculata*. 73. *Metrodorea flavida*. 74. *Pilocarpus pauciflorus*. 75. *Pilocarpus spicatus*. Parede de células lisadas (setas) e ocorrência do epitélio da cavidade secretora (Ep). Barras: 69, 72-73 = 40 μm ; 70-71 = 80 μm ; 73 = 160 μm ; 75 = 320 μm

Figuras 76-83. Secção longitudinal do mesofilo: Detalhe da estrutura secretora. 76. *Esenbeckia leiocarpa*: Célula secretora (CS). 77. *Pilocarpus jaborandi*. 78. *Pilocarpus pauciflorus*. 79. *Raulinoa echinata*. 80. *Galipea trifoliata*. 81. *Metrodorea flavida*. 82. *Pilocarpus alatus*. 83. *Pilocarpus microphyllus*. Parede de células lisadas (setas) e epitélio da cavidade secretora (Ep). Barra: 76-79, 82-83 = 40 μ m; 80-81 = 80 μ m

Figuras 84-88. Secção longitudinal do mesófilo: Cristais. 84-86. Drusas de oxalato de cálcio em compartimentos do parênquima paliádico (setas) em *Pilocarpus alatus*, *Pilocarpus pauciflorus* e *Pilocarpus jaborandi*, respectivamente. 87-88. Presença de cristais com formato de bastonetes em compartimentos no parênquima paliádico (setas) em *Esenbeckia leiocarpa* e *Metrodorea flavida*, respectivamente. Barras: 84-88 = 40 μ m.

Figuras 89-96. Secções transversais da lâmina foliar: coluna da direita com luz polarizada e coluna da esquerda sem luz polarizada. 89-90. *Pilocarpus alatus*: drusas de oxalato de cálcio próximo aos fibras pericíclicas. 91-92. *Pilocarpus pauciflorus*: drusas em compartimentos do parênquima paliádico. 93-96. *Esenbeckia leiocarpa*: cristais no parênquima paliádico (Figs. 93-94) e no floema (Figs. 95-96). Fibras pericíclicas (Fp). Barras: 89-96 = 40 μ m.

Figuras 97-102. Secção transversal da lâmina foliar: Formato biconvexo da nervura mediana. 97. *Galipea trifoliata*. 98. *Metrodorea flavida*. 99. *Pilocarpus alatus*. 100. *Balfourodendron riedelianum*. 101. *Pilocarpus giganteus*. 102. *Pilocarpus spicatus*. Notar as cavidades secretoras (setas). Barras: 97-99, 102 = 160μm; 100 = 620μm; 101 = 320μm;

Figuras 103-108. Secção transversal da lâmina foliar: Formato plano-convexo (Figs. 103-106) e convexo-plano (Figs. 106-107) da nervura mediana. 103. *Esenbeckia leiocarpa*. 104. *Raulinoa echinata*. 105. *Pilocarpus pauciflorus*. 106. *Pilocarpus jaborandi*. 107. *Helietta apiculata*. 108. *Pilocarpus microphyllus*. Cavidades secretoras (setas). Barras: 103 = 320 μ m; 104, 108 = 80 μ m; 105-107 = 160 μ m.

Figuras 109-114. Secção transversal da nervura mediana: detalhe da unidade vascular. 109. *Esenbeckia leiocarpa*: detalhe das fibras pericíclicas (seta) diferenciadas na base da lâmina foliar no canto superior direito. 110. *Galipea trifoliata*. 111. *Metrodorea flavida*. 112. *Raulinoa echinata*. 113. *Pilocarpus alatus*. 114. *Pilocarpus pauciflorus*. Fibras pericíclicas (setas). Barras: 109-114 = 80µm.

Figuras 115-120. Secção transversal da nervura mediana: detalhe da unidade vascular. 115. *Pilocarpus microphyllus*. 116. *Pilocarpus jaborandi*. 117. *Helietta apiculata*. 118. *Balfourodendron riedelianum*: detalhe das fibras pericíclicas (seta) no canto superior direito. 119. *Pilocarpus giganteus*. 120. *Pilocarpus spicatus*. Fibras pericíclicas (setas). Barras: 115-116 = 80µm; 117-118, 120 = 320µm; 119 = 640µm.

Figuras 121-126. Domácia em *Balfourodendron riedelianum*. 121. localização da domácia em vista frontal. 122. Localização e caracterização da domácia em MEV: detalhe dos tricomas tectores unicelular na abertura da cripta (seta). 123-126. secção transversal da domácia: notar a formação da cripta apenas pela redução do parênquima lacunoso. Tt- tricoma tector; Np,- nervura principal; Nl- nervura lateral. Barras: 121, 123-125 = 160µm; 122 = 20 µm; 126 = 320 µm.

Figuras 127-133. Nervação do tipo camptódromo-broquidódromo observado nas espécies de Rutaceae; ângulos das nervuras secundárias e ocorrência de intersecundárias. 127. *Pilocarpus pauciflorus*: ângulos uniformes. 128. *Pilocarpus alatus*: ângulos uniformes e. 129. *Helietta apiculata*: ângulo diminui em direção à base. 130. *Galipea trifoliata*: ângulo uniforme. 131. *Pilocarpus spicatus*: ângulo uniforme. 132. *Pilocarpus jaborandi*: ângulo aumenta em direção à base. 133. *Pilocarpus microphyllus*: uniforme. Legenda: setas vermelhas (intersecundárias fortes) e setas azuis (intersecundárias fracas).

Figuras 134-143. Venação última marginal. 134-137. incompleta: 134. *Pilocarpus microphyllus*. 135. *Pilocarpus alatus*. 136. *Helietta apiculata*. 137. *Esenbeckia leiocarpa*. 138-143. Em forma de arco: 138. *Pilocarpus spicatus*. 139. *Pilocarpus pauciflorus*. 140. *Galipea trifoliata*. 141. *Metrodorea flavida*. 142. *Raulinoa echinata*. 143. *Pilocarpus jaborandi*. Barras: 134 = 160 μ m; 135-138, 141, 143 = 7 μ m; 136, 139-140 = 3 μ m 142 = 13 μ m

Figuras 144-149. classificação das nervuras terciárias (3ª) e quartenárias (4ª). 144. *Pilocarpus spicatus*: Pecurrente alternada em ambas as nervuras. 145. *Galipea trifoliata*: Pecurrente alternada (3ª) e reticulada retangular poligonal (4ª). 146. *Esenbeckia leiocarpa*: Pecurrente alternada (3ª e 4ª). 147. *Pilocarpus microphyllus*: dicotomizada (3ª e 4ª). 148. *Helietta apiculata*: aleatoria reticulada (3ª) e dicotomizada (4ª). 149. *Raulinoa echinata*: aleatoriamente reticulada (3ª) e pecurrente alternada (4ª). Barras: 144-145, 148 = 7 µm; 146 = 4 µm; 147, 149 = 13 µm

Figuras 150-155. Aréolas imperfeitas e terminações das nervuras. 150-154, terminações ramificadas: 150. *Esenbeckia leiocarpa*. 151. *Galipea trifoliata*. 152. *Metrodorea flavida*. 153. *Pilocarpus pauciflorus*. 154. *Pilocarpus spicatus*. 155. Terminação simples: *Pilocarpus alatus*. Barras: 150, 152 = 3 μm ; 151, 153-155 = 7 μm

Figuras 156-161. Aréolas incompletas e terminações das nervuras. 156-157. *Pilocarpus microphyllus*: idioblastos traqueoidais. 158-159. *Raulinoa echinata*: terminações ramificadas. 160-161. *Helietta apiculata*: terminações simples. Barras: 156, 159 = 3 μ m; 157 = 4 μ m; 156, 158 = 13 μ m; 160 = 7 μ m; 161 = 160 μ m

Figuras 162-170. Secções transversais do pecíolo: detalhe da epiderme. 162. *Balfourodendron riedelianum*. 163. *Esenbeckia leiocarpa*. 164. *Helietta apiculata*. 165. *Pilocarpus alatus*. 166. *Raulinoa echinata*. 167. *Galipea trifoliata*. 168. *Pilocarpus giganteus*. 169. *Pilocarpus jaborandi*. 170. *Pilocarpus microphyllus*. Legendas: Pr – periderme, Tt – tricoma tector, Tg – tricoma glandular, Cs – cavidade secretora. Barras: 162, 166-167 = 80µm; 163-164, 168-169 = 40µm; 165, 170 = 160µm.

Figuras 171-175. Seções transversais do pecíolo: detalhe da epiderme. 171. *Pilocarpus pauciflorus*. 172. *Pilocarpus spicatus*. 173. *Balfourodendron riedelianum*. 174-175. *Metrodorea flava*. 176. *Pilocarpus giganteus*. Legendas: Dr - drusa, Pr - Periderme, Le - Lenticela, Ce - Célula esclerenquimática, Cs - Cavidade secretora. Barras: 171, 175-176 = 80µm; 172, 174 = 40µm; 173 = 160µm.

Figuras 177-184. Secções transversais do pecíolo: coluna da direita com luz polarizada e coluna da esquerda sem luz polarizada. 177-178. *Pilocarpus giganteus*: drusas de oxalato de cálcio. 179-180. *Pilocarpus microphyllus*: drusas de oxalato de cálcio. 181-182. *Galipea trifoliata*: Ráfides e cristais prismáticos. 183-184. *Esenbeckia leiocarpa*: cristais prismáticos. Barras: 177-184 = 80µm.

Figuras 185-196. Secções transversais da região basal do pecíolo: aspecto geral.
 185. *Balfourodendron riedelianum*. 186. *Helietta apiculata*. 187. *Pilocarpus spicatus*. 188. *Pilocarpus pauciflorus*. 189. *Raulinoa echinata*. 190. *Metrodorea flavida*. 191. *Pilocarpus alatus*. 192. *Galipea trifoliata*. 193. *Pilocarpus jaborandi*. 194. *Pilocarpus microphyllus*. 195. *Pilocarpus giganteus*. 196. *Esenbeckia leiocarpa*. Barras: 185, 190-191, 193, 195-196 = 640µm, 186-189, 192, 194 = 340µm.

Figuras 197-203. Desenhos dos pecíolos na região basal (coluna a esquerda) e mediana a apical (coluna a direita): detalhe da variação do contorno e do sistema vascular entre estas regiões: 197-198. *Pilocarpus giganteus*. 199-201. *Pilocarpus alatus*. 202-203. *Balfourodendron riedelianum*.

Figuras 204-209. Desenhos dos pecíolos na região basal (coluna a esquerda) e mediana a apical (coluna a direita) - detalhe da variação do contorno e do sistema vascular entre estas regiões: 204-205. *Helietta apiculata*. 206-207. *Raulinoa echinata*. 208-209. *Pilocarpus pauciflorus*.

Figuras 216-221. Secções transversais do pecíolo: Notar as fibras do sistema vascular (setas). 216. *Pilocarpus giganteus*. 217. *Pilocarpus pauciflorus*. 218. *Pilocarpus jaborandi*. 219. *Pilocarpus spicatus*. 220. *Pilocarpus alatus*. 221. *Pilocarpus microphyllus*. Barras: 216 = 1000µm; 217-219, 221 = 520µm; 220 = 320µm.

Figuras 222-227. Secções transversais do pecíolo: detalhe do sistema vascular.
222. *Raulinoa echinata*. 223. *Esenbeckia leiocarpa*. 224. *Galipea trifoliata*. 225.
Helietta apiculata. 226. *Metrodora flavida*. 227. *Balfourodendron riedelianum*.
Barras: 222 = 120µm; 223, 227 = 160µm; 224, 226 = 320µm; 225 = 80 µm.

Figuras 229 A-C. Mapeamento do caracteres 4, 12, 18, 27 e 28. A. Tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar. B. Cavidades secretoras na folha. C. Ocorrência de intersecundária.

Figuras 229 D-E (continuação). Mapeamento do caracteres 4, 12, 18, 27 e 28. D. Tipos de tricomas glandulares no pecíolo. E. Cavidades secretoras no pecíolo.

Figuras 230 A-B. Mapeamento do caracteres 4, 11, 13 e 29. A. Formato das células do parênquima paliçádico. B. Cristais no parênquima paliçádico.

Figuras 230 C-D (continuação). Mapeamento do caracteres 4, 11, 13 e 29.
C. Ráfides no pecíolo. D. Tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar.

Figuras 231 A-B. Mapeamento do caracteres 6 e 7. A. Paredes das células epidérmicas na face adaxial em vista frontal. B. Paredes das células epidérmicas na face abaxial em vista frontal.

Figuras 232 A-C. Mapeamento do caracteres 9, 8, 15, 20, 21 e 22. A. Relação de tamanho entre as células da epiderme face adaxial X abaxial no mesofilo (secção transversal). B. Categoria da nervura terciária. C. Categoria da nervura quaternária.

Figuras 232 D-F (continuação). Mapeamento do caracteres 9, 8, 15, 20, 21 e 22. D. Desenvolvimento das aréolas. E. Formas do sistema vascular na lâmina foliar. F. Tipos de estômatos.

Figuras 233 A-C. Mapeamento do caracteres 1, 3 e 8. A. Tricoma tector na lâmina foliar. B. Ornamentação da cutícula foliar na face adaxial. C. Tipos de estômatos.

Figuras 233 D-F (continuação). Mapeamento do caracteres 9, 8, 15, 20, 21, 22. D. Desenvolvimento das aréolas. E. Formas do sistema vascular na lâmina foliar. F. Tipos de estômatos.

Figuras 234 A-C. Mapeamento do caracteres 4, 23 e 32. A. Terminações das nervuras. B. Células do periciclo no pecíolo. C. Tipos de tricomas glandulares capitados na lâmina foliar.

Figuras 235 A-B. Mapeamento do caracteres 10, 24, 26 e 27. A. Formas das células epidérmicas do pecíolo em secção transversal. B. Tricomas glandulares no pecíolo.

Figuras 235 C-D (continuação). Mapeamento do caracteres 10, 24, 26 e 27 .
C. Números de camadas de parênquima paliádico. D. Tipos de tricomas glandulares no pecíolo.

Figuras 236 A-C. Mapeamento do caracteres 14, 30 e 31. A. Tipos de cristais no parênquima paliádico. B. Cristais prismáticos no pecíolo. C. Drusas de oxalato de cálcio no pecíolo.

Figuras 237 A-C. Mapeamento do caracteres 2,16 e 19. A. Ornamentação da cutícula foliar na face abaxial. B. Venação última marginal. C. Domácias.

Figuras 238 A-C. Mapeamento do caracteres 5, 17 e 25. A. Tricomas glandulares peltados na lâmina foliar. B. Ângulo das nervuras secundárias. C. Tricomas tectores no pecíolo.