Karina Bertechine Gagliardi

Estudo ontogenético da redução floral em Euphorbiaceae e das estruturas secretoras associadas: anatomia e evolução

São Paulo, 2014

Karina Bertechine Gagliardi

**Estudo ontogenético da redução floral em
Euphorbiaceae e das estruturas secretoras associadas:
anatomia e evolução**

**Ontogenetic study of the floral reduction in
Euphorbiaceae and associated secretory structures:
anatomy and evolution**

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

Orientador: Prof. Dr. Diego
Demarco

São Paulo
2014

Gagliardi, Karina Bertechine

Estudo ontogenético da redução floral em Euphorbiaceae e das estruturas
secretoras associadas: anatomia e evolução.

103 páginas

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

1. Ontogênese; 2. Estrutura; 3. Variações morfoanatômicas; 4. Pseudantos;
5. Glândulas; 6. Histoquímica.
-
-

Comissão Julgadora:

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof. Dr. *Diego Demarco*
Orientador

Dedico

*Aos meus queridos pais, por todo amor,
carinho e apoio nesta caminhada que
escolhi.*

A flor

*Olhe, vislumbre a flor
Quantos ais e bem-
querer*

*Detalhes estruturais
Muita coisa a oferecer*

*Assim ela se mostra
Escondida como botão
No momento certo,
preciso
Surge tal uma explosão*

*Expõe suas pétalas
coloridas
Tão marcantes, vistosas
Traz em destaque a
beleza
Gravada em versos e
prosas*

*Algumas não são assim
São pequenas, discretas
Ficam escondidas na
copa
Tem relações mui
secretas*

*Outras sofreram
redução ao extremo
Como no ciátio, uma
inflorescência
Fica até difícil de dizer
que são flores
Mistério a ser
desvendado pela ciência*

*Seu aroma forte,
agressivo ou suave,
adocicado*

*Serve bem de inspiração
Ao amante apaixonado*

*Associada ao amor e
carinho
Muito enfeitada o
ambiente
Preenche o espaço
romântico*

*Desperta o sorriso da
gente*

*Pode ser durável ou
efêmera
Mas com nobre missão
Garante para cada
espécie
Eficiente multiplicação*

*É palco de ilustres
visitantes
Que sem pedir
permissão
Pela corola se adentram
Buscando a
compensação*

*Roubam pólen e néctar
Elementos preciosos da
flor
Mas ela permanece
tranqüila
Vez que não lhe causam
dor*

*Esta pilhagem tem preço
Faz parte da
reprodução
Que será bem sucedida
Se houver polinização*

*No estigma o pólen
germina
O tubo polínico
acelerado
Busca a oosfera que
espera
Realiza o encontro
sonhado*

*Após este ato nupcial
Seu ovário muito cresce
E logo logo percebemos
Imponente fruto que
aparece*

*Este é o propósito da
flor
No início muita beleza,
altivez
Mas com a chegada do
fruto
Deixa o cenário perde a
vez*

*Depois de usada, até
maltratada
Seus elementos vistosos
se vão
Restando o fruto e a
esperança*

*A semente, o embrião
Embrião tão pequenino
Um dia planta adulta
será
Em época bem propícia
Nova flor por certo
surgirá*

Ismar Sebastião Moscheta

Agradecimentos

A **Deus**, por ser minha fonte de luz, motivação e vida!

Agradeço ao Instituto de Biociências da USP, ao curso e aos profissionais da pós-graduação, bem como ao Departamento de Botânica, em especial aos professores e amigos com os quais pude aprender e crescer neste período.

Aos órgãos de fomento Capes e FAPESP que concederam bolsa de estudos para a realização desta pesquisa.

Agradeço com alegria ao meu querido orientador de mestrado, Professor Dr. **Diego Demarco**, a quem cultivo grande admiração e respeito. Tenho inúmeros motivos para agradecer, mas gostaria de ressaltar minha eterna gratidão pela oportunidade dedicada em realizar um sonho que parecia tão distante, por acreditar em mim e me fazer crer que era possível! Além disso, foram muitos os conhecimentos valiosíssimos, apoio, motivação, amizade e compreensão, sem dizer que claro, pude contar com um orientador incrível de uma inigualável paciência em cada um destes 730 dias de mestrado.

Agradeço com muitíssimo afeto a Professora Dra. **Inês Cordeiro** pela colaboração em nossa pesquisa, nos auxiliando com a busca pelas espécies, com as sugestões ao longo do trabalho e principalmente pela harmoniosa parceria que firmamos com este trabalho.

Com carinho inestimável, agradeço ao meu professor de botânica da graduação na Universidade Estadual de Maringá e que também foi meu orientador de iniciação científica e hoje um querido amigo, Professor Dr. **Luiz Antonio de Souza**. Através de suas belas aulas e profissionalismo, despertou em mim o interesse e a paixão pela botânica, ensinando-me, motivando-me e encaminhando-me nesta ciência, sendo hoje grande responsável pela conclusão desta dissertação.

Com alegria, agradeço ao querido Professor Dr. **Ismar Sebastião Moscheta** da Universidade Estadual de Maringá, pelo incentivo constante, por sua importantíssima participação em minha graduação e iniciação científica e claro, pelas poesias inspiradoras.

Agradeço aos membros que fizeram parte da banca de minha qualificação, Dra. **Gladys Flávia Albuquerque Melo de Pinna**, Dra. **Inês Cordeiro** e Dra. **Fabiana**

Leggieri Firetti. Todas as sugestões, críticas e dicas despertaram ideias e com certeza auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Agradeço aos amigos do laboratório de Anatomia Vegetal, **Yasmin, Raquel, Vinícius, Bruna, Nelly, Keyla, Juzinha, Rafinha, Aline, Mário, Fernanda, Renata, Lígia, Mariana, Carol Bastos, Júlio, Caian, Luíza, Nara, Vítor e Giuliano** pelos momentos divertidos e por toda a ajuda durante estes anos, e claro aos técnicos Gisele, Tássia e Irwandro, pela atenção e auxílio nos trabalhos.

Aos amigos abaixo, muito obrigada, vocês foram especiais em todos os momentos, não poderia deixar de citar cada um! Aos queridos Biriguienses, **Natalia, Artur, Angélica, Mariane e Carla**, aos inesquecíveis Maringaenses, **Tiago, Rodrigo, Paula, Heveline e Michelli**, e também aos Paulistanos que na verdade não são tão Paulistanos assim, mas que fizeram minha estadia em São Paulo mais feliz e hoje eu os chamo de melhores amigos, irmãos ou família, **Marcel, Thália, Juliana e Carol Andrino**.

Aos amigos do casa espírita **Mensageiros da Luz**, por toda a energia, pelos ensinamentos e pelo e imenso auxílio amigo durante minha permanência em São Paulo, fazendo meus dias mais leves, me facilitando enxergar a pureza desta bela doutrina!

Agradeço a todos os meus familiares, **tios e tias, primos e primas** muito carinhosos e atenciosos que me acalmaram e me guiaram nos momentos conclusivos de meu trabalho.

Com muita ternura e de forma especial, agradeço aos meus pais! São eles, **Deise e Luiz** os verdadeiros vitoriosos de todas as minhas conquistas. Obrigada meus amores pelo amor incondicional, obrigada pelo apoio que superou a saudade, obrigada pelas palavras de ânimo, pela compreensão de minha ausência e principalmente por serem quem são e nunca me deixarem sucumbir e sim me motivarem a caminhar, como diz meu pai “Avante, Avante!”

Outro agradecimento que mantém meu coração feliz é ao meu **Gui**! Foi para ele a quem eu disse sim há nove anos e desde então mais que um namorado, tenho comigo um verdadeiro companheiro que me incentiva nas decisões e as vive comigo, por mais difíceis que sejam as consequências. Obrigada Gui, pelo apoio constante, pela compreensão de minha ausência e especialmente, por estar ao meu lado me fazendo muito feliz! Assim, obrigada a todos que me ajudaram a compor cada pedacinho desta dissertação!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
CONTEXTUALIZAÇÃO GERAL.....	9
1. DE EUPHORBIACEAE <i>SENSU LATO</i> À EUPHORBIACEAE <i>SENSU STRICTO</i> : UM BREVE HISTÓRICO.....	10
2. AS SUBFAMÍLIAS DE EUPHORBIACEAE E SEUS GÊNEROS DE DESTAQUE QUANTO ÀS FLORES E ESTRUTURAS SECRETORAS.....	15
<i>Cheilosoideae</i>	17
<i>Peroideae</i> ou <i>Peraceae</i> – uma dúvida na evolução de <i>Euphorbiaceae</i>	18
<i>Acalyphoideae</i>	20
<i>Crotonoideae</i>	22
<i>Euphorbioideae</i>	24
CAPÍTULO I	34
CAPÍTULO II.....	68
CONSIDERAÇÕES GERAIS	101

Euphorbiaceae é uma família com grande diversidade floral, despertando o interesse desde meados do século XVIII e que, atualmente, é composta por 218 gêneros e 6.745 espécies, distribuídas em quatro subfamílias (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae). Essas variações morfológicas, tais como a presença de pseudantos e os diferentes níveis de reduções florais, são razões para as divergências em sua classificação e motivação para diversos estudos evolutivos. Considerando a variedade de tipos de pseudantos e flores presentes nas diferentes subfamílias, quatro espécies foram selecionadas para este trabalho: *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. (Acalyphoideae), *Joannesia princeps* Vell. (Crotonoideae), *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. (Euphorbioideae) e *Pera glabrata* Poepp. ex Baill. (de posição incerta). O objetivo desse estudo foi analisar os diferentes graus de redução floral, com ênfase na atividade dos meristemas (padrões de divisão, expansão e diferenciação celular) juntamente com os fatores ontogenéticos (diferenças quanto à formação de primórdios) que levaram a supressão de verticilos e culminaram no surgimento dos pseudantos. Aliado a esta diversidade e à redução dos verticilos, tem-se a importância das estruturas secretoras na manutenção da recompensa ao polinizador e, portanto, o objetivo deste trabalho é complementado com o estudo morfoanatômico destas estruturas e análise histoquímica de seus exsudatos. Botões florais e flores em diversos estágios de desenvolvimento foram analisados em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura para auxiliar na investigação da ontogênese floral. Nas fases iniciais de desenvolvimento dos pseudantos, as primeiras estruturas a se formar são os diferentes níveis de brácteas. Os primórdios florais iniciam formação concomitantemente aos invólucros, sendo a iniciação das flores estaminadas pistiladas diferenciada, ocorrendo a formação de perianto unicamente em *Dalechampia* e *Pera*, formação de constrições nas flores de *Dalechampia* e *Euphorbia* e os pseudantos consideradas protogínicos. As flores de *J. princeps* apresentam iniciação similar à dos pseudantos, diferindo especialmente quanto ao desenvolvimento do perianto, não havendo a formação de constrição. As flores diferem anatomicamente quanto às características do gineceu e também nos padrões de ramificação. Coléteres são encontrados nas fases iniciais de desenvolvimento do ciátio e *Dalechampia* e laticíferos e idioblastos fenólicos ocorrem em diversas fases de *Joannesia* e *Pera*, secretando exsudatos compostos por mucilagem, proteínas, ácidos graxos e fenólicos. A glândula de resina de *Dalechampia* e os nectários de *Euphorbia* e *Joannesia* atuam como glândulas nupciais e iniciam sua formação logo nos primórdios florais, apresentando secreção de exsudatos ricos em lipídios e açúcares, respectivamente. Considerando a ocorrência dos pseudantos em Acalyphoideae e Euphorbioideae e a variação floral presente em Crotonoideae, propõe-se que as características estruturais e as reduções florais observadas nos pseudantos tiveram mais de uma origem ao longo da evolução de Euphorbiaceae e assim sugerimos que os pseudantos evoluíram não apenas de um processo de redução, mas também de uma reorganização das flores ao longo do eixo da inflorescência. As estruturas secretoras estão possivelmente relacionadas à variação morfológica e à história evolutiva do grupo, importantes para o desenvolvimento completo das inflorescências e flores.

Palavras-chave: desenvolvimento floral, Euphorbiaceae, glândulas, histoquímica, variações morfoanatômicas.

Euphorbiaceae is a family with great floral diversity, arousing interest from the mid-eighteenth century, currently composed of 218 genera and 6,745 species, distributed into four subfamilies (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae and Euphorbioideae). The morphological variations such as the presence of pseudanthia and different levels of floral reductions are reasons for the differences in classification and also motivation for several evolutionary studies. Considering the variety of pseudanthia and flowers present in the different subfamilies, four species were selected for this study: *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. (Acalyphoideae), *Joannesia princeps* Vell. (Crotonoideae), *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. (Euphorbioideae) and *Pera glabrata* Poepp. ex Baill. (uncertain position). The aim of this study was to analyze the different degrees of floral reduction, with emphasis on the activity of meristems (patterns of division, expansion and differentiation) along with the ontogenetic factors (differences on the primordia formation) which led to the suppression of whorls and culminated into the emergence of pseudanthia. Allied to this diversity and reduction of whorls, there is the importance of secretory structures in maintaining the pollinators reward and therefore the aim of this study is complemented with the morphoanatomical study of these structures and the histochemical analysis of their exudates. Flower buds and flowers in different stages of development were analyzed in light and scanning electronic microscopy to assist the investigation of floral ontogeny. In the early stages of development of pseudanthia, the first structures to be formed are the different levels of bracts. The floral primordia begin concomitantly as the involucre, with distinct initiation of staminate and pistillate flowers, formation of perianth only in *Dalechampia* and *Pera*, constrictions in the flowers of *Euphorbia* and *Dalechampia* and pseudanthia considered protogynic. The flowers of *J. princeps* show similar initiation as pseudanthia, differing especially in the development of the perianth, without the formation of constriction. The flowers differ anatomically in the gynoecium characteristics and also in branching patterns. Colleters are found in early stages of development of the cyathium and in *Dalechampia*, and laticifers and phenolic idioblasts occur in various stages of *Joannesia* and *Pera*, secreting exudates composed of mucilage, proteins, fatty acids and phenolic compounds. The resin gland of *Dalechampia* and the nectaries of *Euphorbia* and *Joannesia* act as nuptial glands and begin their formation in the floral primordia, presenting secretion of exudates rich in lipids and sugars, respectively. Considering the occurrence of pseudanthia in Acalyphoideae and Euphorbioideae and the floral variations present in Crotonoideae, it is proposed that the structural characteristics and floral reductions observed in pseudanthia had more than one single origin throughout the evolution of Euphorbiaceae and so we suggest that pseudanthia evolved not only by a process of reduction, but also by a reorganization of flowers along the inflorescence axis. Secretory structures are possibly related to morphological variations and the evolutionary history of the group, being important for the complete development of inflorescences and flowers.

Keywords: Euphorbiaceae, floral development, glands, histochemistry, morphoanatomical variations.

Contextualização geral

1. De *Euphorbiaceae sensu lato* à *Euphorbiaceae sensu stricto*: um breve histórico

Em meados do século XVIII, Carolus Linnaeus, botânico, zoólogo e médico sueco, observou e classificou pela primeira vez a família Tricoccae, composta por poucos gêneros e pertencente à ordem Naturales (Bruyset, 1787), família esta que após alguns anos passaria a ser denominada como conhecemos atualmente, Euphorbiaceae.

Esta foi originalmente descrita pelo pesquisador e naturalista francês Antonii Laurentii De Jussieu em 1789 na obra *Genera Plantarum*, na qual em sua versão tradicional, Euphorbiaceae *sensu lato* contava com aproximadamente 30 gêneros divididos em dois grupos, um com flores de estiletes únicos e outro de estiletes bífidos, no entanto ambos apresentando flores unissexuais e óvulos providos de obturador placentário.

No século XIX, pesquisadores apresentaram inovações ao agrupar os representantes de Euphorbiaceae através dos sistemas de classificação, sendo o primeiro deles o sistema Baillon, proposto em 1858 pelo francês Henri Ernest Baillon, cujo sistema classificava os táxons em sete séries: série de *Euphorbia*, série de *Ricinus*, série de Medicinais, incluindo gêneros como *Dalechampia*, *Jatropha*, *Manihot*, *Tragia*, etc., série de *Croton*, série de *Excaecaria*, série de *Dichapetalum* e série de *Phyllanthus*.

Neste mesmo século, ampla descrição e contribuição à classificação foram acrescentadas a família com as monografias do botânico suíço Jean Müller Argoviensis, algumas presentes em clássicos como *Linnaea* de 1865/1866 e *Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis* (De Candolle, A, P) de 1866. As obras de Jean Müller compõem o sistema mülleriano de classificação, o qual de forma detalhada classificou Euphorbiaceae pela primeira vez em subfamílias, tribos e subtribos e assim foi utilizado e adotado por pesquisadores renomados e especialistas, destacando aqui, Grady Linder Webster (Webster, 1975).

Botânico norte-americano e grande estudioso de Euphorbiaceae, Grady Webster aprimorou a classificação proposta por Müller e relatou ampla descrição para os táxons representantes da família, apresentando-a com 300 gêneros agrupados em cinco subfamílias distribuídas pelos neotrópicos (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae) e 52 tribos, sendo diversas destas divididas em subtribos (Webster, 1975). Os caracteres morfológicos foram determinantes no agrupamento das

subfamílias, sendo os principais deles o número de óvulos por lóculo, presença ou ausência de laticíferos e morfologia do grão de pólen.

Com poucas modificações, a família passou para 317 gêneros, cinco subfamílias e 49 tribos, contando com algumas descrições, como diversos tipos de hábitos, desde ervas, arbustos, subarbustos, árvores e até lianas, além de caracteres anatômicos como estrutura da madeira, tegumento da semente, tricomas diversos, desenvolvimento e localização dos estômatos e tipos de laticíferos, bem como flores unissexuais e reduzidas e inflorescências dicasiais que fortaleceram a classificação de Euphorbiaceae *sensu lato* como monofilética, embora propostas já sugerissem outro tipo de circunscrição (Webster 1994 a,b).

Com base em dados morfológicos, estudos corroboraram a circunscrição sugerida por Webster, sendo o principal caráter o número de óvulos por lóculo do ovário e, assim, a exclusão das subfamílias com lóculos biovulados de Euphorbiaceae foi discutida e apoiada como forma de manter seu monofiletismo (Huber 1991, Meeuse 1990).

No final do século XIX e início do século XX, pesquisas filogenéticas baseadas em dados macromoleculares confirmaram o polifiletismo de Euphorbiaceae *sensu lato* (Chase *et al.* 1993, 2002). Estes autores foram os primeiros a propor a segregação de Euphorbiaceae em famílias distintas, segregando as subfamílias Phyllanthoideae e Oldfieldioideae, ambas biovuladas e que passaram a compor as famílias Phyllanthaceae e Picrodendraceae, respectivamente, Putranjivaceae e Pandaceae também foram segregadas, restando as uniovuladas, Euphorbioideae, Crotonoideae e Acalyphoideae, as três compondo a nova família Euphorbiaceae *sensu stricto* (Chase *et al.* 2002), demonstrada na filogenia abaixo (Figura 1).

De acordo com a circunscrição proposta pelos autores acima, Euphorbiaceae *s.s.* seria monofilética, no entanto, o conjunto das subfamílias que a compõem formam um clado de fraco suporte molecular.

Figura 1. Filogenia proposta após a segregação de Euphorbiaceae *sensu lato* (Chase *et al.* 2002), tendo em destaque as novas famílias, incluindo Euphorbiaceae *sensu stricto*.

Wurdack *et al.* (2005) realizaram estudo molecular exclusivamente com espécies de Euphorbiaceae *s.s.* incluindo representantes das três subfamílias e reafirmaram o monofiletismo do grupo, no entanto, sugeriram importantes alterações filogenéticas, dentre estas, dois clados previamente pertencentes à Acalyphoideae foram sugeridos como irmãos de Euphorbiaceae *s.s.* e portanto deveriam ser elevados a nível de subfamília, Peroideae e Cheilosoideae.

O monofiletismo de Euphorbiaceae *s.s.* se manteve em questionamento por diversos autores, e algumas questões curiosas foram levantadas quanto a sua filogenia, como a emergência de Rafflesiaceae entre as Euphorbiaceae *s.s.*, demonstrada por dados moleculares, os quais morfologicamente são de grande questionamento e divergência (Davis *et al.* 2007).

Tokuoka (2007) contribuiu com análises filogenéticas de Euphorbiaceae *s.s.*, em especial quanto as características do desenvolvimento dos óvulos e assumiu que uma camada paliádica exotégmica é uma possível sinapomorfia para todos os representantes da família, exceto para Peroideae, assim corroborando a elevação desta ao nível de subfamília, conforme proposto anteriormente.

Posteriormente em novos estudos filogenéticos, Wurdack & Davis (2009) sugeriram maiores modificações à Euphorbiaceae e elevaram Peroideae ao nível de família, Peraceae, assim excluindo-a de Euphorbiaceae *s.s.*, tornando esta de fato monofilética (Figura 2). Contudo, Peraceae ainda não é totalmente aceita, sendo necessários maiores estudos que reforcem a segregação desta família.

De acordo com Stevens, P. F. (2014, APG website), Euphorbiaceae *s.s.* é atualmente composta por 6.745 espécies e 218 gêneros distribuídos em 4 subfamílias (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae) com distribuição pantropical.

Figura 2. Filogenia elevando Peraceae ao nível de família e incluindo-a entre Rafflesiaceae e Picrodendraceae. (Wurdack & Davis, 2009).

Assim como a descrição de Webster (1975, 1994a,b) para Euphorbiaceae *s.l.*, nesta circunscrição a família mantém representantes de hábitos muito variados, com plantas monoicas e dioicas que podem ou não apresentar látex. As folhas são alternas ou opostas, raramente verticiladas, simples ou compostas, muitas vezes digitadas, com estípulas livres ou unidas, reduzidas a glândulas ou ausentes, podendo também apresentar indumento variado, desde tricomas estrelados a escamiformes.

Quanto às estruturas reprodutivas, Euphorbiaceae *s.s.* caracteriza-se por apresentar inflorescências terminais ou axilares, basicamente cimeiras, podendo ser fascículos, panículas, dicásios, além de racemos, espigas e também de pseudantos, como os registrados em *Dalechampia* e *Euphorbia*, sendo, neste último, mais conhecidos como ciátios. As flores são unissexuais, actinomorfas, monoclâmídeas, diclâmídeas ou aclamídeas, com número de estames variado, filetes livres ou unidos, anteras rimosas e grãos de pólen tricolporados (Judd *et al.* 2009).

O gineceu fornece caracteres morfológicos chave para a família, como o ovário tricarpetal e trilocular, sendo os lóculos uniovulados e em placentação axilar. Os estiletes

podem ser inteiros ou ramificados, o fruto é tipicamente capsular tricoca, sendo as sementes exotégmicas, providas ou não de carúncula com endosperma abundante (Webster 1994).

Quanto à polinização, grande parte dos representantes de Euphorbiaceae é principalmente polinizada por insetos, dentre abelhas, vespas, moscas e borboletas, atraídas pelo néctar que torna as flores atrativas até para alguns pássaros, morcegos e outros mamíferos. Além disso, algumas espécies podem ser polinizadas pelo vento, tais como em *Acalypha*, *Alchornea* e *Ricinus* (Judd *et al.*, 2009).

2. As subfamílias de Euphorbiaceae e seus gêneros de destaque quanto às flores e estruturas secretoras

De acordo com Stevens, P. F. (2014, APG website), Euphorbiaceae *s.s.* é atualmente compreendida por Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae.

Wurdack *et al.* (2005) estabeleceram relações filogenéticas entre as subfamílias, nas quais Cheilosoideae e Acalyphoideae são consideradas as mais basais, Crotonoideae apresenta posição intermediária e Euphorbioideae é a subfamília mais derivada dividida em dois subclados, um com pseudanto e o outro sem (Figura 3).

Figura 3. Filogenia apresentando a relação entre as quatro subfamílias de Euphorbiaceae s.s. (Wurdack *et al.* 2005).

Cheilosoideae

Cheilosoideae é a subfamília mais recentemente estabelecida (Wurdack *et al.* 2005) e é composta pela tribo Hippomaneae subtribo Cheiloseae, dentre as quais encontram-se poucas espécies representadas por apenas dois gêneros, *Cheilosa* e *Neoscortechinia*, distribuídas na regiões da Malásia.

Wurdack *et al.* (2005) classificou esta subfamília como filogeneticamente basal em relação às demais e a descreveu pela presença de árvores dioicas com ausência de látex, indumento simples ou estrelado e folhas alternas, normalmente apresentando glândulas na base da lâmina. As inflorescências são terminais ou axilares, apresentam brácteas com glândulas, com ou sem ramos alongados partindo do eixo da inflorescência. As flores são normalmente monoclamídeas, com nectários em forma de discos nas flores estaminadas, sendo os estames livres, ocorrendo de 5 – 12 e anteras introrsas (Figura 4). O gineceu é constituído por um ovário com um óvulo por lóculo, sendo estes anátropos e com feixes vasculares no tegumento externo.

Figura 4. Desenhos de flores de Cheilosoideae. **Fig 3A.** Vista geral de inflorescências de *Cheilosa montana* Blume. **Fig 3B.** Flores de *C. montana* (Welzen, P.C. van *et al.*, 1993).

Poucos estudos foram realizados para Cheilosoideae e destes, muitos são de cunho taxonômico. Espécies que compõem a flora da região da Malásia são aparentemente as mais pesquisadas e com maiores números de registros na literatura, tendo em destaque os trabalhos de Welzen, P.C. van, R.A. Banka & C.D. Leoncito. (1993) e Welzen, P.C. van (1994) que descreveram os gêneros *Cheilosa* e *Neoscortechinia* e muitas de suas espécies ocorrentes na região, propondo chaves de identificação e possíveis relações filogenéticas entre os táxons dos gêneros.

Peroideae ou *Peraceae* – uma dúvida na evolução de *Euphorbiaceae*

Webster (1994) descreveu *Pereae* como uma das tribos de *Euphorbiaceae s.l.*, tendo *Pera* Mutis como único gênero representante e considerou a tribo como basal em relação aos demais representantes da família, afirmando que o posicionamento de *Pera* em *Euphorbiaceae* poderia ser explicado devido à natureza reduzida de suas flores e presença de inflorescências peculiares.

Atualmente, a inclusão de *Pera* em *Euphorbiaceae* é incerta (Stevens, P. F, 2014 - APG website) e tem sido questionada. Wurdack *et al.* (2005) sugerem que *Pera*, juntamente com *Chaetocarpus* e *Clutia*, cada um pertencente a tribos diferentes, formem subclados dentro de *Peroideae*, já que as sementes de *Pera* são exotestais e o restante da família apresenta sementes exotégmicas.

Posteriormente, como já mencionado, a incógnita sobre o gênero recebe a hipótese de Wurdack & Davis (2009) que consideram *Pera* como um gênero isolado e elevam-no ao nível de família, considerando a filogenia proposta e as características de suas sementes e inflorescências do tipo pseudanto. O reconhecimento da família *Peraceae* seria necessário para manter a monofilia de *Euphorbiaceae*, contudo reconhecimentos futuros são necessários para sustentar a segregação desta família (Stevens, P. F, 2014 - APG website).

Espécies de *Pera* apresentam-se em árvores ou arbustos com indivíduos dioicos, folhas alternas com indumento simples, estrelado ou lepidoto. As flores apresentam-se em pseudantos e são protegidas por duas brácteas involucrais. Os pseudantos apresentam-se reunidos em glomérulos e contêm flores unissexuadas, sendo as estaminadas apétalas com

cálice de 2-4 sépalas, podendo estas serem rudimentares, possuindo 2-8 estames. As flores pistiladas são reduzidas e aclamídeas, possuem gineceu tricarpelar e estilete curto com estigma proeminente (Figura 5) (Webster, 1994).

Figura 5. Desenhos esquemáticos de espécies de *Pera*. **Fig 4A.** Esquema geral de *Pera bicolor* (Klotzsch) Müll. Arg. **Fig 4B.** Pseudanto e flores estaminadas de *P. bicolor*. **Fig 4C.** Pseudanto e flores pistiladas de *P. bicolor*. (modificado de Gillespie & Armbruster, 1997 e Bigio & Secco, 2012).

Poucos são os registros de pseudantos de *Pera*, havendo poucos dados anatômicos, em especial quanto ao desenvolvimento floral e às possíveis estruturas secretoras florais.

Gillespie & Armbruster (1997) em pesquisa e levantamento da flora das Guianas, contribuíram para a descrição de diversos gêneros de Acalyphoideae, dentre eles, *Pera*, e assim colaboraram com as descrições morfológicas e com chaves de identificação e também com hipóteses sobre as relações filogenéticas entre eles.

Bigio & Secco (2010, 2012) colaboraram com estudos taxonômicos para espécies Amazônicas de *Pera*, abordando cerca de 15 espécies, com descrições morfológicas, ilustrações e chaves de identificação, sendo uma das espécies identificada como nova e endêmica na região de Manaus. Seus estudos contribuíram com uma vasta revisão de literatura sobre o gênero, levantando questões sobre a posição do gênero em Euphorbiaceae e a variada morfologia de seus pseudantos.

Freitas *et al.* (2011) investigaram os aspectos da biologia reprodutiva de *Pera glabrata* em uma área do cerrado do estado de São Paulo e relataram dados importantes quanto a fenologia reprodutiva, quanto aos sistemas reprodutivos, de polinização e dispersão de sementes da espécie.

Quanto às pesquisas de cunho anatômico, informações sobre desenvolvimento de óvulos contribuíram para a atual discussão sobre a posição de *Pera*. Tokuoka & Tobe (2003) analisaram estruturalmente óvulos e sementes de Acalyphoideae e suas implicações sistemáticas, revelando que sementes maduras exotestais ocorrem apenas nos gêneros *Clutia* (Clutieae), *Chaetocarpus* (Chaetocarpeae) e *Pera* (Pereae), sendo que o envoltório destas sementes é composto pela exotesta como camada mecânica, assim fortalecendo a filogenia proposta por Wurdack e colaboradores (2005,2009).

Acalyphoideae

Acalyphoideae é reconhecida como subfamília desde Webster (1975, 1994). Aparentemente, a subfamília não é monofilética, sendo composta atualmente por 20 tribos e 116 gêneros, com destaque para *Acalypha* (430 espécies), *Macaranga* (260), *Tragia* (170), *Dalechampia* (120), *Mallotus* (115), *Claoxylon* (80), *Bernardia* (50) e *Ditaxis* (45), totalizando cerca de 1865 espécies de distribuição pantropical (Stevens, P. F, 2014 - APG website).

Composta por árvores, arbustos ou ervas, raramente apresentam látex, indumento simples ou de tricomas ramificados ou lepidotos, as folhas são normalmente alternas com estípulas e glândulas nas bases foliares. As inflorescências são axilares ou terminais, racemosas, cimosas ou reduzidas a glomérulos ou até flores solitárias com brácteas portando glândulas. As flores estaminadas apresentam sépalas frequentemente conatas, pétalas e nectários normalmente ausentes. Os estames variam entre 2 – 100 ou mais, sendo livres ou conatos e pode ocorrer pistilódio. As flores pistiladas são diclamídeas, com sépalas conatas e pétalas livres, disco nectarífero, ovário com dois ou quatro lóculos, estiletes inteiros, bífidos ou multífidos e óvulos anátropos, um em cada lóculo (Webster 1994b).

Ao se tratar das características florais, alguns gêneros de Acalyphoideae destacam-se pelas variações na estrutura da inflorescência, dentre eles *Dalechampia* Plum. ex L que compreende cerca de 100 espécies divididas em seis seções, estando à maioria destas distribuídas pelo continente Americano, com poucas espécies ocorrentes na África, Índia e China (Webster & Armbruster, 1991).

De acordo com Webster (1994b), *Dalechampia* é o único gênero pertencente à tribo Plukenetieae e subtribo Dalechampiinae, a qual se caracteriza por apresentar flores em pseudantos bibracteados com muitos tricomas urticantes. As duas grandes brácteas formam o involúcro do pseudanto e envolvem três flores pistiladas monoclamídeas dispostas em cimeira em posição basal e 8 – 12 flores estaminadas monoclamídeas, dispostas em um pleiocásio terminal que apresenta bractéolas resiníferas próximas às flores. Pistilódios são ausentes e o gineceu é composto por ovário trilocular e estilete alongado com região estigmática (Figura 6).

Figura 6. Desenho esquemáticos do pseudanto de *Dalechampia* em vista frontal e lateral (modificado de Webster & Armbruster, 1991)

De acordo com os estudos taxonômicos, autores afirmam que por apresentar uma morfologia tão variada, o pseudanto de *Dalechampia* é considerado único na natureza, o que despertou grande interesse para diversas áreas.

Maya *et al.* (2002) afirmaram que o pseudanto de *Dalechampia* constitui um modelo para o estudo da evolução floral e Wurdack *et al.* (2005) estabeleceram que *Dalechampia* é um dos gêneros mais especializados de Euphorbiaceae s.s. por apresentar hábito lianescente e pseudanto único.

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2010), tem-se a descrição morfológica desse pseudanto para as diferentes fases ontogenéticas e também é destacada a importância das glândulas de resina como fornecedoras de suprimentos nutritivos aos polinizadores.

Em estudo ecológico Calaça & Vieira (2012) analisam a biologia do pseudanto de *Dalechampia* aff. *triphylla* Lam. e contribuíram com importantes informações quanto as fases reprodutivas do pseudanto, períodos de floração e polinizadores. *Dalechampia* é o único gênero que apresenta pseudantos em Acalyphoideae, no entanto outros gêneros apresentam morfologias também muito variadas quanto à formação e desenvolvimento dos verticilos férteis e estéreis, tais como *Alchornea*, *Acalypha*, *Tragia*, etc., ocorrendo trabalhos especialmente taxonômicos na literatura, como Levin *et al.* (2007), Atha (2008), McPherson (2012) em descrições de novas espécies de *Acalypha* e *Argomuelleria*.

Crotonoideae

Crotonoideae é descrita por Webster (1975, 1994) como composta por 12 tribos e número de gêneros questionável, pois muitos foram erroneamente classificados como pertencentes à Acalypheae e Hippomaneae, sendo a morfologia do pólen considerada essencial para o estabelecimento de membros como “Crotonoids”. Atualmente, a subfamília conta com 68 gêneros e 12 tribos, sendo os principais *Croton* (1300 espécies), *Jatropha* (180), *Manihot* (100), *Trigonostemon* (95) e *Cnidoculus* (75), totalizando cerca de 2050 espécies distribuídas pantropicalmente e algumas em regiões temperadas (Stevens, P. F, 2014 - APG website).

A subfamília é tipicamente representada por árvores, arbustos e ervas, tendo como característica importante em seu diagnóstico a presença de látex em diversos gêneros, sendo este raramente ausente. As folhas são alternas ou opostas, normalmente ocorrendo glândulas foliares, podendo o indumento ser muito variado: simples, estrelado, glandular ou escamoso. As inflorescências são axilares ou terminais, diciasais, racemosas ou em espigas, cujas flores estaminadas são normalmente diclamídeas, com sépalas as vezes conatas e pétalas normalmente livres, discos nectaríferos, às vezes presentes, estames de 3 – 5 a muitos com filetes livres ou conatos, grãos de pólen tricolporados, porados ou inaperturados e pistilódios presentes em alguns gêneros. As flores pistiladas são normalmente monoclamiídeas com sépalas conatas ou livres, com discos nectaríferos presentes ou não, ovário com dois a quatro lóculos, estiletes bífidos a multífidos, raramente inteiros. Os óvulos são anátropos e apresentam-se solitários nos lóculos e sementes frequentemente carunculadas e oleaginosas (Webster, 1994).

Conforme destacado acima, as características florais em Crotonoideae são diversas, em especial quanto à formação dos verticilos estéreis e presença de algumas estruturas secretoras, e assim foram muito importantes no estabelecimento de relações filogenéticas dentro da subfamília.

Joannesia Vellozo é um gênero de grande interesse em estudos evolutivos. Descrito por Webster (1994) como pertencente à tribo Jatropheae, apresenta apenas duas espécies representativas, distribuídas pela América do Sul e suas flores estaminadas e pistiladas são caracterizadas por serem diclamídeas, sendo que as estaminadas apresentam cálice cupular, pétalas livres, 8 a 10 estames com filetes conatos e discos nectaríferos segmentados. As flores pistiladas apresentam cálice também com sépalas conatas e pétalas livres, o gineceu é composto por ovário tricarpelar, trilocular, com óvulos anátropos solitários nos lóculos, estiletes curtos e estigma multífido (Figura 7). Esta similaridade das flores estaminadas e pistiladas quanto à presença dos verticilos estéreis, torna *Joannesia* um gênero importante ao ser utilizado como parâmetro de comparação em estudos ontogenéticos e de evolução floral.

Figura 7. Desenho esquemático de *Joannesia princeps* Vell. **Fig 7A.** Esquema geral de *Joannesia princeps* Vell. **Fig 7B.** Flores estaminadas e flores pistiladas, de *J. princeps*. (Adaptado de <http://www.florabrasiliensis.cria.org.br>).

Embora *Joannesia* seja um gênero de potencial interesse na evolução floral, não se encontram estudos anatômicos ou ecológicos registrados na literatura, sendo os principais

registros relacionados a métodos de extração e formação de biodiesel, considerando que as sementes de *Joannesia* apresentam alta concentração de óleo, sendo este utilizado para fins medicinais, conforme registrado em diversos estudos (Lago *et al.* 1987; Moretto & Fett, 1998; Lorenzi, 2002)

Estudos ontogenéticos contribuem amplamente para o entendimento de relações filogenéticas entre grupos. Liu *et al.* (2008) analisaram a organogênese floral de três espécies de *Jatropha* e através do desenvolvimento dos verticilos férteis puderam corroborar a circunscrição do gênero. Oliveira & Oliveira (2009) investigaram o desenvolvimento de ovários e óvulos de espécies de *Manihot* e constaram diferentes etapas de formação do fruto e da semente que interferem nas formas de abscisão e dispersão das sementes. De- Paula & Sajo (2010) e De-Paula *et al.* (2011) analisaram a ontogênese e as homologias entre os periantos, nectários, anteras e óvulos de espécies de *Croton* e *Astraea*, e com dados anatômicos forneceram suporte à recente segregação de espécies de *Astraea* anteriormente pertencentes à *Croton*.

Como mencionado, os gêneros de Crotonoideae apresentam formas florais variadas, em especial quanto à presença de verticilos estéreis e estruturas secretoras. Estudos ontogenéticos como os destacados acima são de grande contribuição para o entendimento das diversas formas florais, podendo fornecer hipótese quanto aos passos evolutivos que culminaram em tais estruturas.

Euphorbioideae

Webster (1975, 1994) descreveu Euphorbioideae como composta por cinco tribos e 46 gêneros, sendo as principais características que a distinguia das demais subfamílias, a presença de látex de coloração branca, laticíferos não articulados, brácteas portando glândulas, sépalas reduzidas, pétalas normalmente ausentes e grãos de pólen tricolporados. Atualmente, a subfamília conta com cinco tribos e 39 gêneros, com destaque para *Euphorbia* (2420 espécies), *Gymnanthes* (45), *Excoecaria* (40) e *Mabea* (40), totalizando cerca de 2810 espécies distribuídas pantropicalmente e algumas em regiões temperadas (Stevens, P. F, 2014 - APG website).

A subfamília é representada por árvores, arbustos e ervas monoicas, raramente dioicas, com laticíferos não articulados e látex de coloração branca. As folhas são simples ou alternas, apresentando glândulas e estípulas na base, com indumento simples ou ausente. As inflorescências são terminais ou axilares, cimosas ou racemosas, às vezes, panículas ou como pseudantos, como em *Euphorbia* L.. As brácteas normalmente possuem glândulas, as flores são monoclamídeas ou aclamídeas, e os estames são geralmente reduzidos, ocorrendo entre 1 – 20, com filetes livres ou conatos e grãos de pólen tricolporados. As flores pistiladas também são reduzidas, com ovário com dois a três lóculos e estiletes livres ou unidos. Os óvulos são anátropos e solitários nos lóculos (Webster, 1994).

Wurdack *et al.* (2005) afirmaram que Euphorbioideae é a única subfamília monofilética de Euphorbiaceae e que além das características levantadas por Webster, também se destaca pelo alto grau de redução das flores, em especial das estaminadas, com ausência de verticilos estéreis e variáveis arranjos de inflorescências, incluindo formas extremamente condensadas, que resultaram nos pseudantos, presentes em *Euphorbia*. Estes mesmos autores também enfatizaram os dois subclados que compõem a subfamília - subclado com pseudanto e sem pseudanto - afirmando que no primeiro estão presentes apenas os representantes de Euphorbieae e que apresentem a extrema redução floral e modificações no involúcro.

Weberling (1989) interpreta o ciátio de Euphorbiaceae/Euphorbieae, como um modelo de alto grau de integração de flores extremamente modificadas, formando um sistema similar a uma única flor, destacando que este aspecto é especialmente notado ao observar um ciátio a partir de seu eixo principal e das terminações de suas cinco brácteas, as quais são unidas e formam um involúcro. O autor descreve este pseudanto como composto por um conjunto de inflorescências estaminadas localizadas internamente às brácteas, sendo cada flor representada por um único estame. No centro da inflorescência, localiza-se a flor pistilada aclamídea (Figura 8).

Figura 8. Desenhos esquemáticos de ciátios de *Euphorbia* spp. **Fig 9A.** Ciátio de *Euphorbia fulgens* Karw. ex Klotzsch visto de cima e em vista longitudinal. **Fig 9B.** Esquema do ciátio de *Euphorbia lathyris* L. (Adaptado de Weberling, 1989).

Por apresentar arquitetura tão diversificada e única na natureza, o ciátio já recebeu interpretações evolutivas variadas. Prenner & Rudall (2007), Prenner *et al.* (2008), investigaram comparativamente a ontogênese de pseudantos de subtribos distintas de Euphorbieae, com o objetivo de esclarecer homologias e propor hipóteses quanto à evolução do ciátio. Também em análise ontogenética, Narbona *et al.* (2008) analisaram o dimorfismo sexual de *Euphorbia nicaeensis*, e mais recentemente Cacho *et al.* (2010) questionam se o ciátio seria o motivo essencial pelo elevado número de espécies de *Euphorbia* e Prenner *et al.* (2011) levantam a hipótese de que o limite entre flor e inflorescência poderia ser interpretado pela expressão do gene *LEAFY*, tanto em meristemas florais como no meristema da inflorescência.

Os pseudantos em Euphorbioideae são, portanto restritos a Euphorbieae, ocorrendo em outros gêneros, como *Pedilanthus*, *Calycopeplus*, *Anthostema* e *Neoguillauminia* (Weberling, 1989), e assim como estes, *Euphorbia* é considerado um gênero de grande interesse quanto aos estudos de evolução floral, tendo em vista que é o principal gênero da família e sua inflorescência marcada pelo extremo grau de redução dos verticilos, o ciátio.

Além dos pseudantos, Euphorbioideae apresenta outras formas florais muito diversificadas, como as observadas em *Hura* e *Maprounea*, ocorrendo trabalhos recentes na literatura que explorem a tribo Hureae (Oliveira *et al.* 2013), entre outros estudos

taxonômicos vastos sobre Hippomaneae, dentre eles Esser (2002, 2012), Pscheidt & Cordeiro (2012), entre outros, sendo escassos os estudos anatômicos e de evolução que visam entender por meio das variações florais e das estruturas secretoras possíveis passos evolutivos.

Associado às diversas alterações evolutivas na morfologia floral em Euphorbiaceae, uma série de estruturas secretoras surgiram concomitantemente, o que viabilizou diversas estratégias de polinização e de proteção, já que em certos gêneros a redução dos verticilos é uma característica evidente, como destacado acima nos ciátios de *Euphorbia*.

Diversos produtos do metabolismo secundário, como néctar, mucilagem ou goma, proteínas, resinas e compostos fenólicos (Fahn, 1979) são liberados por estruturas secretoras de vários tipos (Evert, 2006). Alguns deles podem ser tóxicos, tais como alcaloides, di ou triterpenoides, taninos entre outros que ocorrem no látex de espécies da família (Judd *et al.*, 2009).

No contexto das relações filogenéticas, tem-se a importância do estudo das estruturas secretoras e da composição de seus exsudatos para entender de que forma as modificações morfoanatômicas e adaptativas dessas estruturas supriram a falta de verticilos atrativos e/ou recursos alimentares aos polinizadores. A literatura conta com alguns trabalhos como Baker *et al.* (1978) em estudo dos nectários extraflorais de *Ricinus communis* L., Rudall (1987) com o estudo dos laticíferos de Euphorbiaceae, Arumugasamy *et al.* (1990) em estudo estrutural, ontogenético e histoquímico dos nectários de *Euphorbia heterophylla* L., Rudall (1994) em estudo dos laticíferos de Crotonoideae, nos quais analisou sua homologia e evolução, Freitas *et al.* (2001) ao analisar os nectários de *Croton sarcopelatus*, entre outros trabalhos.

Quanto à diversidade floral, relatada acima como característica marcante em Euphorbiaceae, poucos são os estudos ontogenéticos que enfatizem a evolução destas formas florais e de suas estruturas secretoras, sendo estas de extrema importância no entendimento de passos evolutivos.

Cabe ressaltar a importância das pesquisas anatômicas na compreensão destes passos evolutivos que levaram a formas florais tão reduzidas e variadas em Euphorbiaceae com base nas filogenias atuais. O estudo estrutural e ontogenético dos pseudantos com suas flores reduzidas e das estruturas secretoras relacionadas a diferentes síndromes de polinização são de grande interesse podem ajudar a revelar como essas alterações ocorreram ao longo da história evolutiva da família.

O objetivo deste trabalho é estudar a ontogênese floral de espécies pertencentes a diferentes subfamílias de Euphorbiaceae e analisar as possíveis homologias com base nos padrões de desenvolvimento das flores e inflorescências (atividade dos meristemas e fatores ontogenéticos), sugerindo as possíveis modificações evolutivas que levaram à formação de pseudantos e redução dos verticilos. Os objetivos são complementados ao caracterizar morfoanatomicamente as estruturas secretoras florais e a composição química de seus exsudatos, relacionando com os diferentes graus de redução floral e às diferentes estratégias para a manutenção da polinização.

A fim de facilitar o processo de publicação, este trabalho está apresentado em capítulos:

Capítulo 1: *Pseudantos em Euphorbiaceae: estrutura e evolução.*

Capítulo 2: *Proteção e atração: brácteas e estruturas secretoras em inflorescências reduzidas de Euphorbiaceae*

Referências

- Arumugasamy, K; Subramanian, R B & Inamdar, J A. (1990). **Structure, ontogeny and histochemistry of cyathial nectaries in *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae).** Acta Societatis Botanicorum Poloniae. v. 59, p. 3-8.
- Atha, D. (2008). **A new species of *Acalypha* (Euphorbiaceae: Acalyphoideae: Acalypheae) from Belize and adjacent Mexico and Guatemala.** v. 60, p. 185-189.
- Baillon, H. (1858). **Etude Generale du Groupe des Euphorbiacées.** Victor Masson, Paris.
- Baker, D. A.; Hall, J.L.; Thorpe, J.R. (1978). **A study of the extrafloral nectaries os *Ricinus communis*.** New Phytology. v. 81, p. 129 – 137.
- Bigio, N. C & Secco, R. S. (2010). **Uma nova espécie de *Pera* (Peraceae) endêmica de Manaus, Amazonas, Brasil.** Rodriguésia. v. 61, p. 77-81.
- Bigio, N. C & Secco, R. S. (2012). **As espécies de *Pera* (Euphorbiaceae s.s) na Amazônia Brasileira.** Rodriguésia. v. 63, p. 163-207.
- Bruyset, F, L. (1787). **Ordines Naturales. In Démonstrations élémentaires de botanique,** p. 456-464.
- Cacho, N. I; Berry, P. E; Olson, M. E; Steinmann V.W; Baum, D. A. (2010). **Are spurred cyathia a key innovation? Molecular systematics and trait evolution in the slipper spurge (Pedilanthus clade: *Euphorbia*, Euphorbiaceae).** American Journal of Botany. v. 97, p. 493-510.
- Calaça, P. S. S. T; Vieira, M. F. (2012). **Biologia do pseudanto de *Dalechampia* aff. *triphylla* Lam. (Euphorbiaceae) e sua polinização por abelhas (Apidae, Meliponina).** v. 10 (3), p. 303-308.
- Chase, M. W.; Soltis, D. E.; Olmstead, R. G.; Morgan, D.; Les, D. H.; Mishler, B. D.; Duvall, M. R.; Price, R. A.; Hills, H. G.; Qiu, Y. L.; Kron, K. A.; Rettig, J. H.; Conti, E.; Palmer, J. D.; Manhart, J. R.; Sytsma, K. J.; Michaels, H. J.; Kress, W. J.; Karol, K. H.; Clarck, W. D.; Hedrén, M.; Gaut, B. S.; Jansen, R.K.; Kim, K. J.; Wimpee, C. F.; Smith, J. F.; Furnier, G. R.; Strauss, S. H.; Xiang, Q. Y.; Plunkett, G. M.; Soltis, P. S.; Swensen, S. M.; Willians, S. E.; Gadek, P. A.; Quinn, C. J.; Eguiarte, L. E.; Golenberg, E.; Learn, J. R.; Graham, S. W.; Barrett, S. C. H.; Dayanandan, S. & Albert, V. A. (1993). **Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from plastide gene *rbcl*.** Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 80 (3), p. 528-580.

Chase, M. W.; Zmarzty, S.; Lledó, M. D.; Wurdack, K. J.; Swensen, S. M. & Fay, M. F. (2002). **When in doubt, put in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences**. Kew Bulletin. v. 57, p. 141-181.

De-Paula, O. C.; Sajo, M. G.; Prenner, G.; Cordeiro, I.; Rudall, P. J. (2010). **Morphology, development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae-Malpighiales)**. Plant Systematics and Evolution. v. 292. p. 1 – 14.

De-Paula, O. C. & Sajo, M. G. (2011). **Morphology and development of anthers and ovules in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae)**. Nordic Journal of Botany. v. 29. p. 505 - 511.

Davis, C. C.; Latvis, M.; Nickrent, D. L.; Wurdack, K. J & David, A. B. (2007). **Floral gigantism in Rafflesiaceae**. Science. v. 315, p. 1812.

Esser, H. J. (2002). **A revision of *Triadica* LOUR. (EUPHORBIACEAE)**. Harvard Papers in Botany. v. 7, p. 17–21.

Esser, H. J. (2012). **The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil**. Rodriguésia. v. 63, p. 209-225.

Evert, R.F. (2006). **Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body – Their Structure, Function and Development**. 3 ed. John Wiley & Sons, Inc.

Fahn, A. (1979). **Secretory tissues in plants**. Ed. Academic press, London.

Flora Brasiliensis – A Obra. (http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=172).

Freitas, L.; Bernardello, G.; Galetto, L.; Paoli, A. A. S. (2001). **Nectaries and reproductive biology of *Croton sarcopetalus* (Euphorbiaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society. v. 136. p. 267 – 277.

Freitas, J. R.; Figueiredo, R. A.; Nadai, I. C & Hardman, L. (2011). **Aspectos da ecologia reprodutiva de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (EUPHORBIACEAE) em uma área de cerrado no estado de São Paulo**. Revista Árvore. v.35, p.1227-1234.

Gillespie, L. J & Armbruster, W. S. (1997). **A Contribution to the Guianan Flora: *Dalechampia*, *Haemutostemon*, *Omphalea*, *Pera*, *Plukenetia*, and *Tragia* (Euphorbiaceae) with Notes on Subfamily Acalyphoideae**. Smithsonian Contributions to Botany. v. 86, p. 3-34.

Huber, H. (1991). **Angiospermen**. Leitfaden durch die ordnungen und familien der Bedektsamer. Gustav Fischer, Stuttgart.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. (2009). **Sistemática Vegetal – um Enfoque filogenético**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.

Jussieu, A. L. (1789). **Euphorbiae**. In Genera Plantarum, p. 384-392.

Lago, R. C. A.; Pereira, D. A.; Siqueira, F. A. R.; Szpiz, R. R.; Oliveira, J. P. (1987). **Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia**. Acta Amazônica, v. 16-17, p. 369-376.

Levin, G. A.; Morton, John K & Robbrecht, Elmar. (2007). **Two New Species of *Acalypha* (Euphorbiaceae) from Tropical Africa, and a Review of Some Robyns Names for Cupricolous Plants from the Democratic Republic of the Congo**. Systematic Botany. v. 32, p. 576-582.

Liu, Huan-Fang.; Deng, Yun-Fei & Liao, Jing-Ping. (2008). **Floral organogenesis of three species of *Jatropha* (Euphorbiaceae)**. Journal of Systematics and Evolution. v. 46, p. 53-61.

Lorenzi, H. (2002). **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v.1, Nova Odessa, São Paulo - SP, Instituto Plantarum.

Maya, V. C. R.; Emmerich, M.; Valle, L. S. (2002). ***Dalechampia Plum ex L.* (Euphorbiaceae) – taxonomia das espécies ocorrentes nas restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Boletim do Museu Nacional (Botânica). v. 119, p. 1-29.

McPherson, G. (2012). **A new species of *Argomuellera* Pax (Euphorbiaceae) from Madagascar**. Adansonia. v. 34, p. 67-70.

Meeuse, A. D. J. (1990). **The Euphorbiaceae auct. Plur. An unnatural taxon**. Privetely printed.

Moretto, E & Fett, R. (1998). **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. Rio de Janeiro: Varela, p. 150.

Muller, J. (1865/66). **Euphorbiaceae**. Linnaea. v. 34, p. 1-224.

Muller, J. 1866. **Euphorbiaceae exceto suborfo Euphorbieae**. In Prodomus Systematis Universalis Regni Vegetabilis (DE Candolle, A. P.). v.15, p.189-1286.

Narbona, E; Ortiz, P. L; Arista, M. (2008). **Sexual dimorphism in the andromonoecious *Euphorbia nicaeensis*: effects of gender and inflorescence development**. Annals of botany. v. 101, p. 717-726.

Oliveira, J. H. G & Oliveira, D. M. T. (2009). **Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Manihot caerulescens* Pohl e *M. tripartita* Müll. Arg. (Euphorbiaceae).** Revista Brasileira de Botânica. v. 32, p.117-129.

Oliveira, L. S. D.; Silva, M. J & Sales, M. F. (2013). **Synopsis of the tribe Hureae (Euphorbioideae, Euphorbiaceae).** Brittonia. v. 65, 310-329.

Prenner, G., Cacho, N, I.; Baum, D., Rudall, P, J. (2011). **Is LEAFY a useful marker gene for the flower-inflorescence boundary in the *Euphorbia cyathium*?** Journal of Experimental Botany. v. 62, p. 345 – 350.

Prenner, G.; Hopper, S, D., Rudall, P, J. (2008). **Pseudanthium development in *Calycopeplus paucifolius*, with particular reference to the evolution of the cyathium in Euphorbieae (Euphorbiaceae--Malpighiales).** Australian Systematic Botany. v. 21, p. 153 – 161.

Prenner, G.; Rudall, P. J. (2007). **Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: Exploring the organ-flower-inflorescence bondary.** American Journal of Botany. v. 94, p. 1612–1629.

Pscheidt, A. C & Cordeiro, I. (2012). **Synopsis of the tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in São Paulo State, Brazil.** Hoehnea. v. 39, p. 347-368.

Rudall, P. (1987). **Laticifers in Euphorbiaceae – a conspectus.** Journal of the Linnean Botany Society. v. 94, p.143-163.

Rudall, P. (1994). **Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution.** Annals of Missouri Botanical Garden. v. 81, p. 270-282.

Souza, L.A.; Silva, A. C.; Moscheta, I.S. (2010). **Morphology and Anatomy of Flowers of *Dalechampia stipulacea* MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae).** Acta Botanica Venezuela. v. 33, p.103-117.

Stevens, P. F. (2014). **Angiosperm Phylogeny Website.** (<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>).

Tokuoka, T. (2007). **Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae *sensu strict* based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution.** Journal of Plant Research. v. 120, p. 511-522.

Tokuoka, T; Tobe, H. (2003). **Ovules and seeds in Acalyphoideae (Euphorbiaceae): structure and systematic implications.** Journal of plant research. v. 116, p. 355-380.

Weberling (1989). **Morphology of flowers and inflorescences**. Ed. Cambridge University. United Kingdom.

Webster, G, L. (1975). **Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae**. Taxon. v. 24, p. 593-601.

Webster, G, L. (1994a). **Classification of the Euphorbiaceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 81 (1), p. 1-144.

Webster, G, L. (1994b). **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 81 (1), p. 33-144.

Webster, G. L. & Armbruster, W. S. **A synopsis of the neotropical species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society. v. 105, p. 137–177.

Welzen, P.C. van. (1994). **Taxonomy, phylogeny, and geography of *Neoscortechinia Hook.f. ex Pax* (Euphorbiaceae)**. Blumea. v. 39, p. 301-318.

Welzen, P.C. van, R.A. Banka & C.D. Leoncito. (1993). **A Revision of the Malesian monotypic genus *Cheilosa* Blume (Euphorbiaceae)**. Blumea. v. 38, p. 161-166.

Wurdack, K. J; Hoffmann, P; Chase, M.W. (2005). **Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid *rbcL* and *trnLF* DNA sequences**. American Journal of Botany. v. 92(8), p.1397-1420.

Wurdack, K.J; Davis, C.C. (2009). **Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life**. American Journal of Botany. v. 96 (1), p. 1551–1570.

Pseudantos em Euphorbiaceae: estrutura e evolução

Karina Bertechine Gagliardi^{1,*} & Diego Demarco¹

¹Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo, Brasil

*Para correspondência. E-mail kabertechine3@usp.br

Abstract

Floral diversity is a remarkable characteristic in Euphorbiaceae, particularly highlighted in relation to the reduction of whorls and inflorescences, providing unique and complex floral shapes such as pseudanthia, being the cyathium the most studied one. The occurrence of pseudanthia in different genera arouses interest for evolutionary and floral ontogenetic studies, and thus the selected genera for this study were *Dalechampia* L. (Acalyphoideae), *Euphorbia* L. (Euphorbioideae) and *Pera* Mutis of uncertain position, with the aim to analyze the different degrees of floral reduction, with emphasis on the activity of meristems and ontogenetic factors which led to the suppression of whorls and reduced inflorescences, trying to clarify the steps of floral evolution which culminated into the pseudanthia. Flowers and inflorescences of *Joannesia princeps* Vell. (Crotonoideae), which does not present pseudanthia were analyzed as an outgroup. Inflorescences and flowers in several stages of development were analyzed in light microscopy and scanning electron microscopy to assist the investigation of floral ontogeny. In the early stages of pseudanthia development, the first structures to be formed are the different levels of bracts. The floral primordia begin simultaneously to the involucre, with distinct initiation of staminate and pistillate flowers, formation of perianth only in *Dalechampia* and *Pera*, constrictions in the flowers of *Euphorbia* and *Dalechampia*, and pseudanthia considered protogynic. The flowers of *Joannesia* show similar initiation as pseudanthia, differing especially in the development of the perianth, without the formation of constriction. The flowers differ anatomically in the gynoecium characteristics and also in branching patterns. Considering the occurrence of pseudanthia in Acalyphoideae and Euphorbioideae and the floral variations present in Crotonoideae, it is proposed that the structural characteristics and floral reductions observed in the pseudanthia had more than one single origin throughout the evolution of Euphorbiaceae and so we suggest that pseudanthia evolved not only by a process of reduction, but also by a reorganization of flowers along the inflorescence axis. In addition, future ontogenetic studies combined with gene expression analysis could elucidate several issues related to the activity of inflorescence and flowers meristems.

Keywords: anatomy; development; floral reduction; inflorescence; meristem activity.

Introdução

A diversidade floral observada entre as famílias de Angiospermas em relação à redução de verticilos e da inflorescência como um todo é particularmente evidente em Euphorbiaceae que apresenta formas florais variadas e inflorescências únicas, estruturalmente complexas, tendo como exemplo os pseudantos, caracterizados pelo extremo grau de redução, e ocorrência de convergências, homoplasias e paralelismos ao longo da evolução.

O tipo de pseudanto mais conhecido da família é o ciátio, presente em *Euphorbia* e que já foi alvo de diversos estudos (Prenner & Rudall 2007, Narbona *et al.* 2008, Cacho *et al.* 2010, Prenner *et al.* 2011, entre outros); contudo, Prenner & Rudall (2007) destacam que os pseudantos não estão apenas restritos à Euphorbiaceae, mas também ocorrem em *Dalechampia* e *Pera*, ambos localizados anteriormente em Acalyphoideae, mas que agora são considerados filogeneticamente distantes, o que enfatiza a importância do desenvolvimento floral em Euphorbiaceae, visto que os pseudantos surgiram mais de uma vez na família, sendo um caso de evolução convergente.

A ocorrência de grande diversidade floral e de diversas homoplasias nas diferentes subfamílias de Euphorbiaceae gera dificuldade de classificação, sendo alvo de muitos estudos taxonômicos e filogenéticos, como os de Webster (1972; 1994), Armbruster (1988), Steinmann & Porter (2002), Berry *et al.* (2005), Wurdack *et al.* (2005), Tokuoka (2007), Cacho *et al.* (2010), Yang *et al.* (2011), Horn *et al.* (2012), dentre diversos estudos sobre a evolução e ontogênese floral, como Tokuoka & Tobe (1995), Huan Fang *et al.* (2008), De-Paula *et al.* (2010), Souza *et al.* (2010) e em especial estudos cujo objetivo é entender o surgimento do ciátio, Prenner & Rudall 2007, Prenner *et al.* 2011.

Recentemente, Endress *et al.* (2013) analisaram as estruturas florais e propuseram tendências evolutivas para os representantes de Malpighiales e afirmaram que após as diversas alterações das árvores filogenéticas, diversos novos subclados surgiram, os quais requerem com urgência estudos de desenvolvimento floral na elucidação da estrutura, biologia e evolução destes grupos, tendo como destaque Euphorbiaceae que apresenta cerca de 200 gêneros ainda desconhecidos no que se refere aos variados caracteres florais.

Além disso, Rafflesiaceae foi recentemente incluída em Malpighiales (Davis 2007) e a análise do desenvolvimento floral é capaz de desvendar alguns passos evolutivos em comum entre as pequeníssimas flores de Euphorbiaceae e as flores gigantes de Rafflesiaceae (Endress 2010).

Embora exista um esforço para se compreender o surgimento das diversas formas florais de Euphorbiaceae, pouco se sabe sobre a evolução e os fatores ontogenéticos que levaram ao surgimento dos pseudantos encontrados na família.

Dessa forma, os gêneros selecionados para este trabalho foram *Dalechampia* L. (Acalyphoideae), *Euphorbia* L. (Euphorbioideae) e *Pera* Mutis de posição incerta, com o objetivo de analisar os diferentes graus de redução floral, com ênfase na atividade dos meristemas e fatores ontogenéticos que levaram à supressão de verticilos e redução das inflorescências, tentando-se esclarecer as etapas de evolução floral que culminaram na formação dos pseudantos. Flores e inflorescências de *Joannesia princeps* Vell. (Crotonoideae) foram analisadas como grupo externo e não apresentam pseudantos.

Material e Métodos

Inflorescências contendo flores em diversos estágios de desenvolvimento foram coletadas no Jardim do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e no Instituto de Botânica de São Paulo. Material testemunha dos espécimes utilizados foi providenciado e as exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade de São Paulo: *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. = K. Gagliardi & D. Demarco – 5 (SPF), *Joannesia princeps* Vell. = K. Gagliardi & D. Demarco – 6 (SPF), *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. = K. Gagliardi & D. Demarco – 7 (SPF), *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. = K. Gagliardi & D. Demarco – 8 (SPF).

O meristema da inflorescência, botões florais, flores em pré-antese, antese e pós-antese foram isoladas, fixadas em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%) por 24 h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada) por 48 h (Lillie 1965), mantidas em bomba de vácuo e estocadas em álcool etílico 70%.

O material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940), incluído em Paraplast e seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de astra e safranina (Gerlach 1984) e montadas em resina sintética, com fotomicrografias obtidas em microscópio de luz Leica DMLB.

Para o estudo ontogenético, análises micromorfológicas também foram realizadas utilizando o material fixado em FAA. Após o isolamento das peças, esse material passou por dessecação em ponto crítico, foi metalizado com ouro e analisado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940.

Resultados

Ontogênese de Dalechampia meridionalis (Acalyphoideae), Euphorbia sipolisii (Euphorbioideae) e Pera glabrata.

As espécies analisadas são monoicas e apresentam flores estaminadas e pistiladas em seus pseudantos, exceto *Pera*, que é dioica e apresenta pseudantos unissexuados.

Os pseudantos apresentam um conjunto de brácteas, dentre brácteas mais externas, brácteas involucrais, coloridas em *Euphorbia* e *Pera*, e o involucelo, relacionado com as flores ou inflorescências secundárias. Em fase inicial de desenvolvimento, as primeiras estruturas a se formar são as brácteas externas (Figura 1A, B), seguidas pelo desenvolvimento das brácteas involucrais (Figura 1B-F) pós-genitamente fundidas (Figura 1F) e, por último, o desenvolvimento do involucelo em *Dalechampia* (Figura 1G) e em *Pera* (Figura 1H).

Durante o desenvolvimento das brácteas do involucelo e internamente a estas, é possível observar a fase inicial de formação e alongamento do eixo da inflorescência com os primórdios das flores estaminadas em *Dalechampia* e *Pera* (Figuras 2A e 1H). Essas flores são, portanto, as primeiras estruturas reprodutivas dos pseudantos a se desenvolverem. A primeira flor a se formar está localizada na posição terminal do eixo da inflorescência, seguida pela formação de outras flores em sentido basípeto (Figura 2A).

Em *Euphorbia*, logo após a formação do involúcro e internamente a este (Figura 2B e C), tem-se o desenvolvimento da flor pistilada terminal, seguida pela ramificação da inflorescência através da formação de primórdios de inflorescências secundárias estaminadas parcialmente envoltas por projeções das brácteas involucrais (Figura 2C). Assim como o eixo principal da inflorescência, os ramos laterais também são determinados, havendo a formação de uma flor estaminada em posição terminal, seguida pela diferenciação de outras flores, também em sentido basípeto.

Depois de desencadeada a formação dos meristemas florais, a ontogênese das flores é iniciada, observando-se a origem do único verticilo estéril presente, o cálice, nas flores de *Dalechampia*, cujas sépalas são quase totalmente unidas através de conação pós-gênita (Figura 2D). Além do perianto, também se observa o desenvolvimento dos filetes e anteras, havendo cerca de 20 estames por flor com iniciação assincrônica. No pseudanto estaminado de *P. glabrata*, observa-se também a formação dos estames, com filetes

reduzidos, sem a formação de verticilos estéreis, formando-se 4 agrupamentos com 4 estames cada (Figura 2E) de iniciação também assincrônica.

Neste mesmo estágio de desenvolvimento, é a flor pistilada do ciátio que inicia seu desenvolvimento pela formação dos primórdios carpelares separados (Figura 2F), tornando-se fundidos através de conação pós-gênita do ovário, similar ao que ocorre no pseudanto pistilado de *Pera*, no qual quatro flores são formadas internamente ao involúcro, também de forma assincrônica, sem a formação de perianto.

Os pseudantos de *Euphorbia* e de *Pera* apresentam até esta fase um desenvolvimento contínuo, diferentemente do observado para *D. meridionalis*, que embora apresente a flor estaminada terminal como a primeira a se formar, existe um retardo em sua maturação que pode ser verificado através da análise estrutural das diversas flores (Figura 2D). Neste pseudanto, após o início do desenvolvimento da porção estaminada, um novo conjunto de brácteas destaca-se em sua base. Este novo conjunto é formado por brácteas sobrepostas umas às outras adquirindo a estrutura de uma glândula de formato globoso (Figura 2D e 2G).

Nesta fase, é notável a formação de um pistilódio no pseudanto estaminado de *Pera*, posicionado lateralmente ao androceu e melhor observado anatomicamente (Figura 6D). Em *Dalechampia*, após a formação de diversos botões florais estaminados, ocorre a formação de um único ramo lateral que originará uma inflorescência secundária pistilada (Figura 2H). Suas flores apresentam cálice e gineceu em formação, cujas sépalas e carpelos ainda não estão unidos. A conação das peças desses verticilos ocorrerá em uma fase posterior (Figura 2H). Igualmente ao eixo principal da inflorescência, o desenvolvimento dessa inflorescência secundária pistilada se inicia pela flor terminal e, portanto, o sentido de diferenciação das flores é basípeto.

Pseudantos de *Pera* com tamanho intermediário de desenvolvimento, já apresentam flores quase completamente formadas, tanto as pistiladas, com óvulos jovens, como as estaminadas (Figura 3A-C) e o involúcro totalmente fundido apresentando apenas uma pequena fenda (Figura 3A). Em *Dalechampia*, observa-se o rápido desenvolvimento das flores pistiladas, com estiletos que seguem livres do ápice do ovário, estigmas receptivos e, portanto flores que já se encontram em antese, enquanto flores estaminadas ainda estão em fase de botão floral (Figura 3D e E).

No ciátio em tamanho intermediário, o involúcro está completo e observa-se a formação dos estiletos, que seguem livres através do alongamento da porção distal dos primórdios carpelares (Figura 2F), além da formação dos estigmas e óvulos (Figuras 3F e

G). Nesta fase, as flores estaminadas já apresentam estames iniciando a formação dos grãos de pólen (Figura 3H) e a flor pistilada mantém o desenvolvimento acelerado em relação às cinco inflorescências estaminadas, que se desenvolvem de forma irregular e assíncrona em relação ao ciátio, que já possui o involúcro completo com nectários na porção superior, além das brácteas externas e muitos coléteres entre estas (Figura 3G).

Durante esta transição entre a fase intermediária e a fase madura dos pseudanto é que se torna evidente em *Dalechampia* e *Euphorbia* a formação de uma leve constrição no pedicelo da flor pistilada, próximo à base do ovário (Figura 3I). Nas flores estaminadas de *Euphorbia*, o surgimento dessa constrição em uma estrutura filiforme e contínua, marca o limite entre o pedicelo e o filete, não havendo qualquer formação de sépalas ou pétalas em ambas as flores (Figura 3J).

Em fase madura dos pseudantos, as flores apresentam gineceu completo, com estigma único e achatado em *Pera*, livres e arredondados em *Euphorbia* e *Dalechampia*, estilete único em *Pera*, e três estiletos fundidos em *Dalechampia* (Figura 3K) e que permanecem livres em *Euphorbia* (Figura 3I). Os ovários são tricarpelares/triloculares em *Dalechampia* e *Euphorbia*, e tetracarpelar/tetralocular em *Pera*, todas com lóculos uniovulados, sendo estes epítropos (Figuras 3C e F).

Nesta fase, *Dalechampia* apresenta flores pistiladas em antese e com os estigmas receptivos (Figura 3K) e a porção estaminada da inflorescência ainda com flores em fases variadas, algumas iniciando abertura das sépalas, como é o caso da flor terminal (Figura 3E). A abertura e o amadurecimento destas flores estaminadas ocorrem da flor terminal para as flores mais basais.

No ciátio maduro, a flor pistilada é a primeira a se tornar receptiva, com estigma receptivo com superfície em paliçada, estilete alongado e as inflorescências secundárias estaminadas também apresentam algumas flores maduras, sem que haja a formação de verticilos estéreis (Figura 3J), apenas a constrição se torna mais conspícua. Com o desenvolvimento da flor pistilada, às vezes, já iniciando a formação do fruto, as flores estaminadas são elevadas gradativamente acima do involúcro através do desenvolvimento dos pedicelos (Figura 3J) e apenas neste nível mais elevado é que ocorre a deiscência da antera, liberando os grãos de pólen.

Nesta fase madura, os pseudantos de *P. glabrata* encontram-se totalmente desenvolvidos, de forma que os estames, com as anteras em deiscência de aspecto foliáceo (Figura 3L), apresentam liberação dos grãos de pólen e o pseudanto pistilado inicia as transformações para a formação do fruto.

As flores de *Joannesia* não estão organizadas em pseudantos, ocorrendo dispostas ao longo de um eixo alongado, são díclinas e diclamídeas.

As primeiras estruturas a se formar na inflorescência são as brácteas da inflorescência, seguidas pelas bractéolas, associadas aos primórdios florais. Estes iniciam formação a partir das flores pistiladas em posição terminal e seguem desenvolvimento pelas flores laterais estaminadas, em sentido basípeto, como uma cimeira. As flores apresentam formação das sépalas que ocorre aparentemente por fusão congênita e as pétalas são livres (Figura 4A e B).

Em botão floral o desenvolvimento do cálice e da corola permanecem constantes em ambas as flores estaminada e pistilada. Nesta fase, a flor pistilada inicia formação do gineceu a partir da formação dos carpelos aparentemente separados, tornando-se fundidos através de conação pós-gênita do ovário (Figura 4C). Simultaneamente, inicia-se a formação dos estiletes livres (Figura 4C), caracterizado pelo alongamento da porção distal do ovário, que se mantém como duas estruturas distintas. Com o alongamento gradual dos estiletes, concomitantemente os óvulos são formados (Figura 4D) e a região estigmática torna-se mais arredondada.

Nesta fase, observa-se na flor estaminada o crescimento assincrônico de 6 - 8 estames, com a formação inicial dos filetes e início da formação das anteras (Figura 4E). Ainda nesta fase pouco mais desenvolvida, o cálice e a corola continuam em crescimento e alongamento, as pétalas permanecem fechadas e intercaladas.

Em pré-antese as flores pistiladas apresentam gineceu totalmente desenvolvido, com região estigmática adquirindo formato variado e ramificado (Figura 4F), sendo esta ramificação ainda mais evidente na fase de antese, ocupando toda a porção apical do ovário e tornando-se receptivo (Figura 4G), estilete curto e fundido, ovário tricarpetal/trilocular, com lóculos uniovulados, sendo estes epítropos (Figura 4D).

Os estames apresentam-se pouco mais desenvolvidos, com filetes mais longos e unidos entre si, as anteras já formadas, porém jovens, apresentam grãos de pólen em formação (Figuras 4H e I). Os estames são didínamos, com as anteras mais achatadas e grãos de pólen prontos para ser liberados por fendas longitudinais (Figura 4J). Estas características florais são as mesmas para a fase de antese, com a diferença dos verticilos estéreis que se apresentam totalmente abertos.

Em pós-antese, as flores pistiladas apresentam-se em senescência, os estiletes são pouco mais alongados do que na fase anterior e a região estigmática torna-se ainda mais achatada e contorcida (Figura 4K). Os estames apresentam filetes ainda mais longos, porém com anteras de aspecto contorcido e já senescentes (Figura 4L).

Anatomia das flores

Verticilos estéreis

As flores de *Euphorbia* e *Pera* são aclamídeas e, portanto desprovidas de cálice e corola. *Dalechampia* e *Joannesia* apresentam perianto, sendo este muito similar nas flores estaminadas e pistiladas, composto por sépalas glabras em *Dalechampia* (Figura 5A) e com indumento tricomatoso em *Joannesia*, com epiderme de ambas as faces unisseriada em *Dalechampia* e papilosa em *Joannesia* (Figura 5B). O mesofilo é homogêneo, composto por 6-8 camadas de células parenquimáticas nas sépalas de *Dalechampia*, e 8-11 camadas nas sépalas de *Joannesia*, com células de paredes finas, pequenas e arredondadas, ocorrendo feixes vasculares colaterais nas regiões de nervura central de ambas as espécies (Figura 5B), e também nervuras secundárias e terciárias de feixes colaterais, idioblastos e cordões de laticíferos ao longo das sépalas de *Joannesia* (Figura 5B).

As pétalas de *Joannesia* são anatomicamente similares às suas sépalas, com epiderme da face abaxial unisseriada, levemente paliçada e indumento tricomatoso. O mesofilo é homogêneo, com muitas camadas de células parenquimáticas, amplas, vacuolizadas, de formatos variados, ocorrendo alguns idioblastos cristalíferos e nervura central composta por xilema e floema em posições opostas, compondo feixe colateral, sendo que além destes, outros feixes colaterais compõem nervuras secundárias. A epiderme da face adaxial é similar a da face abaxial, no entanto é glabra com células mais alongadas radialmente e papilosa da região mediana em direção ao ápice (Figura 5C).

Verticilos férteis

O ovário apresenta epiderme externa unisseriada de células pequenas e isodiamétricas, com indumento composto por tricomas tectores em *Dalechampia* e *Joannesia*, que também apresenta epiderme externa do ovário com reentrâncias ao longo de toda a parede, deixando-o com um aspecto segmentado. O mesofilo é homogêneo e delimitado por três regiões nos pseudantos (Figura 5D) e duas em *Joannesia* (Figura 5E),

ocorrendo feixes vasculares imersos no mesofilo, sendo tanto os dorsais quanto os ventrais do tipo colateral. A epiderme interna é bisseriada com células alongadas tangencialmente em *Dalechampia* e multisseriada em *Joannesia* (Figura 5E).

Os óvulos são bitegumentados, com tegumento externo mais espesso e tegumento interno menos espesso em todas as espécies. A micrópila é formada por ambos os tegumentos, sendo observado obturador placentário e bico nucelar em todas as espécies (Figura 5D e F).

O estilete das flores em antese é sólido (Figura 5G), exceto em *Euphorbia* que é oco (Figura 5H), composto por epiderme de ambas as faces unisseriada de células pequenas e cúbicas, podendo ocorrer poucos tricomas tectores unicelulares. A região central é predominantemente parenquimática nos estiletos sólidos e com canal secretor de células paliádicas no estilete oco. No estilete sólido observa-se um cordão de células parenquimáticas fortemente coradas, com citoplasma de aspecto denso, formato alongado, alcançando a região estigmática e partindo do ápice do ovário, sendo este conjunto de células, o tecido transmissor, ocorrendo muitos idioblastos fenólicos em *Joannesia* (Figura 5G). O estilete é vascularizado por feixes que bifurcam na região estigmática (Figuras 5G-I).

Os estigmas possuem epiderme unisseriada em paliçada com atividade secretora (Figuras 5G e I), sendo eles bífidos em *Dalechampia*, trifido em *Euphorbia*, multífido em *Joannesia* e único em *Pera*.

Quando o androceu está totalmente desenvolvido, os filetes são vascularizados por um único feixe e possuem células parenquimáticas de tamanhos e formatos variados, todas vacuoladas e de paredes finas, dentre as quais podem ocorrer idioblastos cristalíferos com drusas (Figura 6B e C). Também nesta fase observa-se o pistilódio presente lateralmente ao androceu de *Pera*, anatomicamente composto por epiderme de células cuboídes à levemente alongadas radialmente, tecido parênquimático e tricomas em forma de escamas sob a epiderme. (Figura 6C e D).

As paredes das anteras apresentam células epidérmicas alongadas tangencialmente, endotécio com células em paliçada e espessamentos de parede formando trabéculas, além de tapete secretor que é totalmente consumido durante a formação dos grãos de pólen (Figuras 6A- C, 6E e F).

Padrão de ramificação das inflorescências

As inflorescências das espécies estudadas são morfológicamente muito distintas, e cada pseudanto é considerado um tipo único para a família.

As flores estão envoltas e protegidas pelo involúcro. *Dalechampia* possui flores díclinas espacialmente separadas em uma cimeira composta, que apresenta inflorescências secundárias estaminadas e pistilada (Figura 7A), diferentemente do pseudanto de *P. glabrata*, que apresenta um único conjunto de 4 inflorescências no pseudanto estaminado e 4 flores, no pseudanto pistilado, sendo que estes organizam-se sob forma de glomérulo no eixo da inflorescência (Figura 7C e D).

Euphorbia sipolisii também apresenta suas flores dispostas em uma cimeira composta; contudo, diferentemente de *D. meridionalis*, há uma única flor pistilada e aclamídea terminal na posição central do ciátio, circundada por cinco inflorescências secundárias estaminadas cimosas, cada uma composta por 4 flores pediceladas e aclamídeas, uniestaminadas, associadas a projeções de cada uma das brácteas involucrais. Inicialmente, essas flores possuem seus estames inclusos no interior do involúcro, os quais são expostos acima desta barreira física de maneira gradativa (Figura 7B).

As flores de *Joannesia* também se dispõem em cimeira composta, sendo a flor terminal de cada ramificação pistilada e as flores dos ramos laterais, estaminadas (Figura 7E).

FIGURAS

Figura 1. Fase inicial de desenvolvimento dos pseudantos. **Fig 1A.** Formação das brácteas externas do pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. Note os coléteres nas axilas das brácteas (*asterisco*) (100µm). **Fig 1B.** Pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. em início de formação (500µm). **Fig 1C.** Pseudantos estaminados de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (500µm). **Fig 1D.** Pseudanto pistilado de *Pera* com início de formação do involúcro (200µm). **Fig 1E.** Pseudanto estaminado de *Pera* com involúcro em desenvolvimento (200µm). **Fig 1F.** Pseudanto de *Euphorbia* com involúcro em desenvolvimento. Note as brácteas livres (*asterisco*) (100µm). **Fig 1G.** Pseudanto de *Dalechampia* com involucelo e flor terminal em formação. **Fig 1H.** Microscopia eletrônica confocal do pseudanto de *Pera*, indicando as brácteas do involucelo em formação, destacadas em elipses (50µm). (be = brácteas externas; co = coléteres; ic = involucelo; in = involúcro).

Figura 2. Pseudantos em fase jovem de desenvolvimento. **Fig 2A.** Pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. com flor estaminada terminal e flores em desenvolvimento no sentido basípeto (seta). Note flor terminal (*asterisco*) (100µm). **Fig 2B.** Pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. com involúcro formado. Note flor pistilada terminal em formação (*asterisco*) (200µm). **Fig 2C.** Pseudanto de *Euphorbia* com involúcro removido, flores estaminadas em formação em sentido basípeto (seta) e projeções do involúcro (seta fina) (100µm). **Fig 2D.** Pseudanto de *Dalechampia* com flor estaminada terminal com cálice formado. Note glândula de resina em início de desenvolvimento (*asterisco*) (200µm). **Fig 2E.** Pseudanto de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. com involúcro removido, demonstrando os grupos de estames (1mm). **Fig 2F.** Pseudanto de *Euphorbia* com involúcro removido e gineceu em formação, fusão dos carpelos e alongamento dos estiletes (100µm). **Fig 2G.** Pseudanto de *Dalechampia* em vista lateral com glândula de resina (seta) (200µm). **Fig 2H.** Pseudanto de *Dalechampia* em vista lateral demonstrando a inflorescência pistilada jovem e cálice com sépalas em início de formação (seta) (200µm).

Figura 3. Pseudantos em fase intermediária de desenvolvimento e maduros. **Fig 3A.** Invólucro de pseudanto estaminado de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (500µm). **Fig 3B.** Inflorescências estaminadas do pseudanto de *Pera* (200µm). **Fig 3C.** Óvulo jovem do pseudanto pistilado de *Pera* (200µm). **Fig 3D.** Pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. com inflorescência pistilada com estiletes alongados e estigmas já receptivos (200µm). **Fig 3E.** Pseudanto de *Dalechampia* em estágio intermediário de desenvolvimento, com flor terminal senescente (seta) e demais flores estaminadas em botão floral e outras em antese (500µm). **Fig 3F.** Gineceu de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. em corte longitudinal demonstrando óvulo jovem (100µm). **Fig 3G.** Pseudanto de *Euphorbia* com invólucro removido, gineceu e androceu jovens (200µm). **Fig 3H.** Antera de *Euphorbia* em desenvolvimento com tapete secretor sendo consumido e grãos de pólen sendo formados (20µm). **Fig 3I.** Pseudanto de *Euphorbia* maduro com constrição na base do ovário (seta) e inflorescências estaminadas desenvolvidas (500µm). **Fig 3J.** Anteras maduras de *Euphorbia* em corte longitudinal com constrição conspícua (seta) e paredes das anteras características (200µm). **Fig 3K.** Inflorescência pistilada madura do pseudanto de *Dalechampia* (200µm). **Fig 3L.** Inflorescência estaminada do pseudanto de *Pera* demonstrando filetes com aspecto foliáceo (500µm). (co = coléteres).

Figura 4. Ontogênese das flores de *Joannesia princeps* Vell. **Fig 4A.** Fase meristemática de desenvolvimento, com primórdios de formação dos verticilos estéreis. Note o primórdio de flor estaminada em posição central (*asterisco*) (200µm). **Fig 4B.** Início de formação do gineceu das flores pistiladas (100µm). **Fig 4C.** Carpelos em vista superior, demonstrando fusão e formação dos estiletes (100µm). **Fig 4D.** Óvulo jovem preso ao funículo (20µm). **Fig 4E.** Flor estaminada em botão floral com sépalas e pétalas removidas indicando a iniciação dos estames, alongamento dos filetes (seta) (200µm). **Fig 4F.** Gineceu em pré-antese (500µm). **Fig 4G.** Estigma ramificado de gineceu em antese (200µm). **Fig 4H.** Flor estaminada em início de pré-antese com estames em desenvolvimento (1mm). **Fig 4I.** Anteras em desenvolvimento com grãos de pólen sendo produzidos (200µm). **Fig 4J.** Estames maduros, com anteras desenvolvidas e deiscentes (500µm). **Fig 4K.** Estigma com ramificação proeminente, gineceu em pós-antese (500µm). **Fig 4L.** Estames em pós-antese (2mm). (pe = pétalas; se = sépalas).

Figura 5. Anatomia das flores: verticilos e gineceu. **Fig 5A.** Flores estaminada do pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. com sépalas formadas (200µm). **Fig 5B.** Sépala e pétala *Joannesia princeps* Vell. (200µm). **Fig 5C.** Porção apical da sépala e pétala *Joannesia* (100µm). **Fig 5D.** Ovário e óvulo de *Dalechampia* com bico nucelar em contato com obturador (seta) (100µm). **Fig 5E.** Ovário e óvulo de *Joannesia* (500µm). **Fig 5F.** Óvulo epítropo de *Joannesia* com bico nucelar em contato com obturador (seta) (100µm). **Fig 5G.** Estiletes e estigma de *Joannesia* (100µm). **Fig 5H.** Estilete oco de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. (100µm). **Fig 5I.** Estilete e estigmas de *Euphorbia* (100µm).

Figura 6. Anatomia das flores: androceu. **Fig 6A.** Estame de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. em desenvolvimento com constrição conspícua (seta) (200µm). **Fig 6B.** Flor de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. com estames em desenvolvimento (500µm). **Fig 6C.** Pseudanto estaminado de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. com estames em desenvolvimento e pistilódio localizado lateralmente ao androceu (seta) (500µm). **Fig 6D.** Detalhe do pistilódio de *Pera* (100µm). **Fig 6E.** Antera de *Pera* em desenvolvimento com tapete secretor sendo consumido (100µm). **Fig 6F.** Antera de *Joannesia princeps* Vell. em desenvolvimento com tapete secretor sendo consumido (100µm).

Figura 7. Padrão de ramificação das inflorescências. **Fig 7A.** Pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. **Fig 7B.** Pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. **Fig 7C.** Pseudanto estaminado de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. **Fig 7D.** Pseudanto pistilado de *Pera*. **Fig 7E.** Flores de *Joannesia princeps* Vell. dispostas em cimeira composta.

Discussão

Ontogênese e estrutura dos pseudantos e flores

Nos três pseudantos as primeiras estruturas a se formarem em fase muito jovem de desenvolvimento são as brácteas, seguidas por algumas gemas reprodutivas observadas nas espécies. No entanto, é na fase de botão floral que o desenvolvimento das flores se inicia de fato, considerando que em *D. meridionalis* os primórdios das flores estaminadas são os primeiros a iniciar seu desenvolvimento, ao contrário de *E. sipolisii* que apresenta o primórdio da flor pistilada antecedendo o desenvolvimento das flores estaminadas. Já em *Pera*, o desenvolvimento das flores ocorre isoladamente, já que os pseudantos são unissexuados.

Em estudo realizado por Prenner & Rudall (2007) verificou-se que algumas diferenças ontogenéticas destacáveis, como é o caso de *Euphorbia myrsinites*, considerada pelos autores um exemplo típico da subtribo Euphorbiinae. Nesta espécie, as primeiras estruturas a se formar são as brácteas, assim como nos pseudantos aqui estudados; no entanto, simultâneo a formação destas, tem-se as flores estaminadas, caracterizando etapas ontogenéticas similares às descritas para *D. meridionalis* e *Pera*. Para *Neoguillauminia cleopatra*, os autores observaram que a formação das brácteas é quase simultânea à formação das flores estaminadas e à formação da flor central pistilada.

O pseudanto de *Dichostemma glaucescens* também foi analisado por Prenner & Rudall (2007) e neste, observa-se uma diferença significativa entre as espécies citadas acima e também em relação às espécies de estudo e às demais Euphorbiaceae, pois além da formação das brácteas ocorrer quase que simultaneamente à pares de estames, o gineceu é o último componente do ciátio a se formar e é exclusivamente tetrâmero.

Narbona *et al.* (2008) analisaram o pseudanto de *Euphorbia nicaeensis* e verificaram que após a formação das brácteas, as primeiras flores a iniciar sua formação são as estaminadas, assim como em *Dalechampia* e *Pera*, diferentemente de *E. sipolisii*.

Prenner *et al.* (2011) verificaram fatores ontogenéticos quase que exclusivos dentre as inflorescências de Euphorbiaceae, como é o caso de *Calycopeplus paucifolius*, considerada um perfeito intermediário entre os pseudantos da família e um arquétipo do ciátio (Croizat, 1937).

Assim como nos pseudantos deste estudo, Prenner *et al.* (2011) verificaram que a formação do pseudanto de *Calycopeplus paucifolius* também se inicia com um conjunto de

brácteas, no entanto o desenvolvimento das flores estaminadas como da única flor pistilada ocorre de forma simultânea.

Ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento dos pseudantos aqui estudados, o desenvolvimento de verticilos estéreis foi verificado apenas nas flores de *D. meridionalis* e nas flores de *Joannesia*, no entanto nas fases de pré-antese e antese ocorre a formação de uma constrição em regiões distintas do pedicelo das flores estaminadas de ambas as espécies e também da flor pistilada de *E. sipolisii*.

A literatura é escassa no estudo dos pseudantos, sendo a maior parte dos estudos voltados para a tribo Euphorbieae (Prenner & Rudall 2007, Narbona *et al.* 2008, Cacho *et al.* 2010, Prenner *et al.* 2011, Prenner *et al.* 2011b), praticamente não havendo estudos ontogenéticos para os pseudantos das demais subfamílias de Euphorbiaceae.

Muitos destes estudos registraram a ocorrência de perianto completo ou vestigial em pseudantos, no entanto a formação da constrição é frequentemente verificada nestas inflorescências.

Dentre as espécies analisadas por Prenner & Rudall (2007), *Euphorbia myrsinites* (subtribo Euphorbiinae, considerada mais derivada) apresenta formação da constrição apenas em flores estaminadas e em fase de antese, sendo esta constrição a delimitação entre o filete e o pedicelo, além de atuar como uma zona de abscisão após a abertura das anteras, processo similar ao descrito para *D. meridionalis* e *E. sipolisii*.

Estes mesmos autores verificaram esta constrição em *Neoguillauminia cleopatra* (subtribo Neoguillauminiinae, filogeneticamente intermediária), sendo esta diferenciada pela formação de uma estrutura vestigial próxima a constrição e de aspecto foliar, o que os autores interpretam como um possível perianto e assim afirmam que esta estrutura corrobora a hipótese da redução dos verticilos na evolução dos pseudantos.

Neste mesmo trabalho, os autores relatam que em *Anthostema madagascariense* (subtribo Anthosteminae, considerada mais basal) ocorre a formação de perianto tanto nas flores estaminadas quanto nas pistiladas, assim como nas flores do pseudanto de *D. meridionalis* e em *Joannesia*.

Prenner *et al.* (2008) verificaram que em *Calycopeplus paucifolius*, a constrição ocorre apenas em algumas flores estaminadas, porém, está presente na flor pistilada.

Conforme nossos resultados, a presença de constrição é conspícua em determinadas fases de desenvolvimento. Anatomicamente, observamos que nestas regiões de constrição ocorre uma invaginação do filete ou do pedicelo, cujas células se tornam menores e mais compactas.

Em fases mais desenvolvidas, na exposição e maturação das flores, alguns fatores ontogenéticos também se destacaram como distintos para as espécies estudadas. Em *D. meridionalis*, nem todas as flores apresentam cálice aberto em um mesmo momento, sendo esta diferença temporal similar em *E. sipolisii*, cujos estames são expostos para fora do involúcro aos poucos, sendo que quando a flor pistilada já se encontra quase que em pós-antese, com transformações na parede do ovário na formação do fruto, as flores estaminadas podem encontrar-se ainda em desenvolvimento. Em *P. glabrata* e em *J. princeps* as flores apresentam maturação acelerada e no pseudanto o involúcro permanece fechado, porém com flores já totalmente desenvolvidas em seu interior.

O destaque na ontogênese dos pseudantos ocorre, portanto, quanto ao início da formação, determinado pela flor estaminada em *D. meridionalis*, pela pistilada em *E. sipolisii*, e em *Pera* ocorre de forma similar a uma flor, sendo ditado pelas flores terminais de cada pseudanto, estaminado ou pistilado.

Conforme descrito acima, as inflorescências apresentam flores em diferentes fases de desenvolvimento ao longo da maturação do pseudanto, tendo como destaque a diferença no início e no final da maturação.

Dentre os poucos pseudantos estudados em Euphorbiaceae, nota-se que a iniciação dos primórdios florais ocorre de formas distintas, conforme relatado nas espécies deste trabalho e com as investigações disponíveis na literatura. No entanto, de maneira geral e em comparação com flores isoladas, como *J. princeps*, os pseudantos apresentam rápido desenvolvimento do gineceu, mesmo este não sendo o primeiro a se formar nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Quanto ao desenvolvimento e estrutura dos pseudantos, algumas características são particularmente importantes.

Baseado nas similaridades em relação à posição e à constituição tecidual entre as brácteas dos pseudantos e flores de *Joannesia* podemos deduzir que todas elas têm igual função de proteção das flores e que as projeções involucrais do ciátio de *E. sipolisii* são análogas ao involucelo de *D. meridionalis* e *P. glabrata*.

O gineceu das espécies apresenta estigmas secretores, tecidos transmissores e óvulos anátropos-epítropos, crassinucelados com bico nucelar. Todas essas características são frequentemente registradas em espécies de Euphorbiaceae e foram relatadas por Tokuoka & Tobe 1995, Tokuoka & Tobe 2006, Tokuoka 2007, Souza *et al.* 2010, Gagliardi *et al.* 2012, Gagliardi *et al.* 2013. Este conjunto de caracteres anatômicos é considerado único e exclusivo de Euphorbiaceae (Sutter & Endress 1995).

Considerando a ontogênese e o desenvolvimento dos pseudantos aqui estudados e seguindo as classificações para inflorescências propostas por Weberling (1989), Souza (2003) e Judd *et al.* (2009), os grandes grupos de inflorescências, determinada (cimeira) e indeterminada (racemo), devem ter como padrão não só a presença da flor terminal em algum estágio de desenvolvimento, mas principalmente a direção de abertura e de maturação das flores.

Se analisarmos estas definições, notamos uma complexidade de classificação para os pseudantos aqui estudados. *E. sipolisii* possui uma inflorescência determinada, com uma flor pistilada terminal com maturação inicial em relação às demais flores estaminadas, sendo o ciátio protogínico. No entanto, *D. meridionalis* é composto por uma inflorescência determinada, cuja flor estaminada terminal se diferencia anteriormente às flores pistiladas; porém, possui um retardo na sua maturação, sendo o pseudanto como um todo, também protogínico. Os pseudantos de *Pera* podem ser interpretados ontogeneticamente como flores diclinas, e a inflorescência de *Joannesia* também pode ser interpretada como uma cimeira protogínica, sendo as flores pistiladas as primeiras a iniciarem o desenvolvimento e apresentarem maturação completa.

Deduções filogenéticas na evolução dos pseudantos e redução dos verticilos

As espécies analisadas são pertencentes às Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae, sendo *Pera* de posição questionável. Segundo Wurdack *et al.* (2005), Acalyphoideae é a subfamília mais basal e claramente parafilética, enquanto Crotonoideae tem posição filogenética intermediária, ainda sem fortes indícios de seu monofiletismo, e Euphorbioideae, tida como a mais derivada e a única totalmente monofilética. Esses autores também propuseram modificações importantes para Euphorbiaceae, sugerindo duas novas subfamílias, Cheilosoideae e Peroideae, mudanças estas que foram reavaliadas por Wurdack & Davis (2009) que corroboraram a criação de Cheilosoideae, porém sugeriram a elevação de Peroideae ao nível de família, com o ressurgimento de Peraceae.

Webster (1994) afirma que os pseudantos de Euphorbiaceae estão concentrados nos gêneros *Euphorbia*, *Dalechampia* e *Pera* e assim Prenner & Rudall (2007) propõem que possivelmente houve três origens independentes para estas inflorescências únicas dentre as Angiospermas.

As reduções florais são observadas como um processo que aparentemente ocorreu mais de uma vez ao longo de Acalyphoideae e as subtribos de Euphorbieae, pois como

discutido no item acima, *Dalechampia* apresenta flores monoclamídeas e com constrictões conspícuas nas estaminadas, já as flores de *Joannesia* apresentam cálice e corola desenvolvidos e ausência de constrictões, e em contrapartida, as reduções se intensificam novamente na evolução com Anthosteminae, que apresenta representantes com cálice e constrictões tanto nas flores estaminadas como pistilada, Neoguillauminiinae com espécies de perianto reduzido e constrictões apenas nas flores estaminadas, e Euphorbiinae com flores totalmente nuas e com constrictões conspícuas, como em *E. sipolisii*.

Sabe-se que a ocorrência dos pseudantos é restrita à Acalyphoideae e Euphorbioideae e que Crotonoideae apresenta flores que podem estar dispostas em inflorescências ou isoladas, ser diclamídeas ou monoclamídeas, monóclinas ou díclinas (Webster 1994).

De acordo com os padrões de ramificação das inflorescências, classificamos *D. meridionalis* como um pseudanto composto uma inflorescência composta do tipo cimeira monocasial ou monocásio, onde as flores masculinas estão dispostas ao longo do eixo da inflorescência e o único ramo lateral forma uma inflorescência secundária pistilada. Todavia, diversos autores realizaram estudos morfológicos para *Dalechampia* e mesmo com questionamentos taxonômicos, muitas similaridades foram registradas, no entanto com terminologias diferenciadas para alguns aspectos da inflorescência.

Webster & Webster (1972) analisaram morfológicamente *Dalechampia scandens* em comparação com demais espécies do gênero, estudo no qual os autores interpretaram estas inflorescências como sendo um pleiocásio estaminado terminal justaposto por uma cimeira de 3 flores pistiladas e que este conjunto envolto por duas brácteas corrobora o fato de que estas inflorescências bibracteadas e com involucelo composto por inúmeras brácteas, são exclusivas dentro de Euphorbiaceae.

Ainda neste estudo e com base unicamente nas observações morfológicas, os autores discutem a possível relação evolutiva da inflorescência de *Dalechampia* como sendo aliadas às inflorescências das tribos Plukenetieae e Euphorbieae.

Da mesma forma, temos a ramificação do ciátio de *E. sipolisii*, que pode ser esclarecido como composto por uma única flor pistilada central e terminal, em uma cimeira composta que apresenta ramificações formadas por inflorescências secundárias estaminadas também cimosas, constituindo uma panícula determinada.

O ciátio é o pseudanto típico de *Euphorbia*. De acordo com Ferri *et al.*(1981), esta inflorescência é definida como uma cimeira reduzida em que há uma flor feminina nua, terminal, pedicelada, e várias flores masculinas que a circundam, cada uma reduzida a um

estame articulado com o pedicelo, sendo todo o conjunto protegido por um involúcro caliciforme de brácteas providas de glândulas. Webster (1994) caracteriza o ciátio como uma inflorescência do tipo pseudanto, composta por uma única flor pistilada terminal e quatro ou cinco monocásios ou dicásios estaminados ao redor, com perianto reduzido ou ausente.

Estudos atuais questionam a classificação deste pseudanto e Prenner & Rudall (2007) propõem a hipótese de que o ciátio é composto por um conjunto de inflorescências estaminadas, cada uma adjacente a uma bráctea, de forma que todo este conjunto circunda a flor pistilada, central e terminal.

Os pseudantos de *Pera* foram classificados como tendo suas flores organizadas em glomérulos, tanto dentro do involúcro, como o conjunto de pseudantos ao longo de um eixo. Internamente às brácteas involucrais, existem agrupamentos de flores, sendo duas em posição terminal. Atualmente existe muita dificuldade de interpretação quanto a estes pseudantos e a descrição existente não registra dados sobre a ramificação internamente ao involúcro

A inflorescência de *Joannesia* apresenta suas flores organizadas em conjuntos de cimeiras, sendo a principal diferença entre os pseudantos estabelecida pelo alongamento entre os ramos laterais, o que possivelmente está relacionado à atividade do meristema da inflorescência.

Dada à complexidade estrutural dos pseudantos e a importância dos estudos evolutivos florais, novos estudos ontogenéticos aliados a análises de expressão de genes relacionados à formação de flores, poderiam elucidar a atividade dos meristemas florais e das inflorescências na formação precoce ou tardia das flores.

Conclusões

Os pseudantos apresentam morfologias muito diferentes, assim como as relatadas para as subfamílias às quais pertencem. Os fatores ontogenéticos que podem explicar esta diferença estão presentes logo no início da formação dos primórdios florais, tais como a formação de diversas categorias de brácteas, presença ou ausência de cálice, além das constrições verificadas nas flores de *Dalechampia* e *Euphorbia*.

Considerando a ocorrência dos pseudantos em Acalyphoideae e Euphorbioideae e também a variação floral presente em Crotonoideae, subfamília considerada filogeneticamente intermediária, propõe-se que as características estruturais e as reduções

florais observadas nos pseudantos tiveram mais de uma origem ao longo da evolução de Euphorbiaceae.

Assim sugerimos que os pseudantos evoluíram não apenas de um processo de redução, mas também de uma reorganização das flores ao longo do eixo da inflorescência.

Referências

Armbruster (1984). **Two new species of Dalechampia (Euphorbiaceae) from Mesoamerica.** Systematic Botany. v. 9 (3), p. 272-278.

Armbruster (1988). **A new species, section, and synopsis of Dalechampia (Euphorbiaceae) from Costa Rica.** Systematic Botany. v. 13 (3), p. 303-312.

Berry, P. E; Hipp, A. L; Wurdack, K. J; Van, B; Riina, R. (2005). **Molecular phylogenetics of the giant genus Croton and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data.** American journal of Botany. v. 92 (9), p. 1520-1534.

Cacho, N. I; Berry, P. E; Olson, M. E; Steinmann V.W; Baum, D. A. (2010). **Are spurred cyathia a key innovation? Molecular systematics and trait evolution in the slipper spurge (Pedilanthus clade: Euphorbia, Euphorbiaceae).** American Journal of Botany. v. 97 (3), p. 493-510.

Calça, P. S. S. T; Vieira, M. F. (2012). **Biologia do pseudanto de Dalechampia aff. triphylla Lam.(Euphorbiaceae) e sua polinização por abelhas (Apidae, Meliponina).** v. 10 (3), p. 303-308.

Croizat, L. (1937). **On the classification of Euphorbia. II. How should the cyathium be interpreted?** Bulletin of the Torrey Botanical Club. v. 64 (1), p. 523–536.

Davis, G. L. (1966). **Systematic embryology of the angiosperms.** Ed. John Wiley & Son, New York.

Endress, P. K. (2010). **Flower structure and trends of evolution in eudicots and their major subclades.** Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 97 (1), p. 541–583.

Endress, P. K; Davis, C.C; Matthews, M. L. (2013). **Advances in the floral structural characterization of the major subclades of Malpighiales, one of the largest orders of flowering plants.** Annals of Botany. v. 111 (5), p. 969-985.

Ferri, M. G.; Menezes, N. L.; Monteiro, W. R. (1981). **Glossário Ilustrado de Botânica.** Ed. Nobel. São Paulo.

Gagliardi, K. B; Rosado, A. Souza, L. A; Moscheta, I. S. Albiero, A. L. M. (2012). **Structure and development of fruits and seeds of weed species of Euphorbiaceae**. Acta Botanica Brasilica. v. 26 (1), p. 38-45.

Gagliardi, K. B; Souza, L.A; Albiero, A. L. M. (2013). **Comparative fruit development in some Euphorbiaceae and Phyllanthaceae**. Plant Systematics and Evolution. v. 300 (5), p. 775–782.

Gerlach, D. **Botanische Mikrotechnik: eine Einführung**. 3ed. Stuttgart, Georg Thieme, 1984.

Horn, J. W; Van E, B. W; Morawetz, J. J; Riina, R; Steinmann, V.W. (2012). **Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus Euphorbia L. (Euphorbiaceae)**. Molecular phylogenetics and Evolution. v. 63 (2), p. 305-326.

Huan-Fang, L; Deng, Y. F; Liao, J. P. (2008). **Floral organogenesis of three species of Jatropa (Euphorbiaceae)**. Journal of Systematics and Evolution. v. 46 (1), p. 53-61.

Johansen, D.A. **Plant microtechnique**. (1940). McGraw-Hill, New York.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. (2009). **Sistemática Vegetal – um Enfoque filogenético**. 3 ed. Artmed, Porto Alegre.

Lillie, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. (1965). 3ed. McGraw-Hill, New York.

Narbona, E; Ortiz, P. L; Arista, M. (2008). **Sexual dimorphism in the andromonoecious Euphorbia nicaeensis: effects of gender and inflorescence development**. Annals of botany. v. 101 (5), p. 717-726.

Paula, O.C. **Morfologia e Desenvolvimento Floral em Croton L. e Astraea KLOTZSCH (Euphorbiaceae sensu stricto)**. (2010). Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

Pax, F. Hoffmann, K. (1919). **Euphorbiaceae- Dalechampiae**. Das Pflanzenreich. Ed. A. Engler. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann. p. 1-59.

Prenner, G., Cacho, N, I.; Baum, D., Rudall, P, J. (2011). **Is LEAFY a useful marker gene for the flower-inflorescence boundary in the Euphorbia cyathium?** Journal of Experimental Botany. v. 62(1), p. 345 – 350.

Prenner, G.; Hopper, S. D., Rudall, P. J. (2008). **Pseudanthium development in *Calycopeplus paucifolius*, with particular reference to the evolution of the cyathium in Euphorbieae (Euphorbiaceae--Malpighiales)**. Australian Systematic Botany. v. 21, p. 153 – 161.

Prenner, G.; Rudall, P. J. (2007). **Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: Exploring the organ-flower-inflorescence boundary**. American Journal of Botany. v. 94 (10), p. 1612–1629.

Rudall (1992). **Anatomy of flowering plants: an introduction to structure and development**. Ed. Cambridge University. United Kingdom.

Souza (2003). **Morfologia e anatomia vegetal**. Ed. UEPG, Ponta Grossa.

Souza, L.A.; Silva, A. C.; Moscheta, I.S. (2010). **Morphology and Anatomy of Flowers of *Dalechampia stipulacea* MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae)**. Acta Botanica Venezuela. v. 33 (1), p.103-117.

Steinmann, V. W; Porter, J. M. (2002). **Phylogenetic relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) based on ITS and ndhF sequence data**. Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 89(1), p. 453–490.

Sutter, D; Endress, P. K. (1995). **Aspects of gynoecium structure and macrosystematics in Euphorbiaceae**. Bot. Jahrb. Syst. v. 116 (1), p.517–536.

Tokuoka, T. (2007). **Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae sensu strict based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution**. Journal of Plant Research. v. 120, p. 511-522.

Tokuoka, T; Tobe, H. (1995). **Embryology and systematics of Euphorbiaceae sens. lat.: a review and perspective**. Journal of Plant Research. v. 108 (1), p. 97–106.

Tokuoka, T; Tobe, H. (2006). **Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae sens. str.** Journal of plant Research. v.119 (6), p. 599-616.

Weberling (1989). Morphology of flowers and inflorescences. Ed. Cambridge University. United Kingdom.

Webster, G.L. (1994). **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 81, p. 33-144.

Webster & Webster (1972). **The morphology and relationships of *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae)**. American Journal of Botany. v. 59 (6), p. 573-586.

Wurdack, K.J; Davis, C.C. (2009). **Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life.** American Journal of Botany. v. 96 (1), p. 1551–1570.

Wurdack, K. J; Hoffmann, P; Chase, M.W. (2005). **Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid *rbcL* and *trnLF* DNA sequences.** American Journal of Botany. v. 92(8), p.1397-1420.

Yang, Y; Berry, P.E. (2011). **Phylogenetics of the Chamaesyce clade (Euphorbia, Euphorbiaceae): reticulate evolution and long-distance dispersal in a prominent C4 lineage.** American Journal of Botany. v. 98 (1), p. 1486–1503.

Proteção e atração: brácteas e estruturas secretoras em inflorescências reduzidas de Euphorbiaceae

Karina Bertechine Gagliardi^{1,*} & Diego Demarco¹

¹Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, São Paulo, Brasil

*Para correspondência. E-mail kabertechine3@usp.br

Abstract

The secretory structures are related to protection and attraction of pollinators, and corroborating these functions, there is the flower-pollinator relationship as an essential link in the interpretation of different floral morphologies, such as those occurring in the Euphorbiaceae pseudanthia. Given the floral reduction feature of these inflorescences, and the possible absence of sepals and petals in Euphorbiaceae flowers, secretory structures and bracts enable pollination strategies and protection and the aim of this study is to analyze the ontogeny and structure of glands present in unique floral types of Euphorbiaceae, as well as the relationship of these glands with the floral morphology of the species. The genera selected for this study were: *Dalechampia* L. (Acalyphoideae), *Euphorbia* L. (Euphorbioideae), *Pera* Mutis (of uncertain position) and *Joannesia* Vell. (Crotonoideae) used as an outgroup for comparison about the presence of whorls and types of glands. Inflorescences and flowers in several stages of development were analyzed by light microscopy and scanning electron microscopy and histochemical tests were performed to analyze the composition of exudates. Bracts, bracteoles, involucre and involucler have similar anatomical characteristics, differing in the indumentum and mesophyll, being absent at certain stages of flower development. Colleters are found in early stages of development of the cyathium and in *Dalechampia* and secretory idioblasts and laticifers occur in several stages of *Joannesia* and *Pera*, secreting exudates composed of mucilage, proteins, fatty acids and phenolic compounds. The resin gland of *Dalechampia* and nectaries of *Euphorbia* and *Joannesia* act as nuptial glands and begin their formation immediately in the floral primordia, presenting secretion of exudates rich in lipids and sugars, respectively. Secretory structures and different level of bracts are possibly related to morphological variation and the evolutionary history of the group, being important for the complete development of inflorescences and flowers.

Keywords: floral variations, pseudanthia, glands, histochemistry, ontogeny, evolution.

Introdução

Os tecidos secretores vegetais estão relacionados às estratégias de sobrevivência das plantas nos diferentes ambientes possivelmente decorrentes de duas tendências evolutivas: uma delas direcionada à proteção contra herbívoros e outra à atração de polinizadores (Fahn, 1979).

Corroborando a função das estruturas secretoras na atração dos polinizadores, tem-se que a relação flor-polinizador pode ser essencial na interpretação de flores com morfologias não usuais (Cluter *et al.* 2007).

Dentre estas morfologias, Euphorbiaceae se destaca pela ocorrência de inflorescências exclusivas, como os pseudantos que são inflorescências que funcionalmente atuam como uma única flor. Associado às diversas alterações evolutivas na morfologia floral da família, uma série de estruturas secretoras surgiram concomitantemente, o que viabilizou variadas estratégias de polinização e de proteção (Cacho *et al.* 2010), já que em certos gêneros a redução dos verticilos é uma característica evidente e peças usualmente relacionadas à atração de polinizadores, tais como pétalas e sépalas, estão ausentes, assim as brácteas assumindo função de atração e proteção (Webster 1994; Prenner & Rudall 2007, 2008).

Alguns estudos foram realizados com o propósito de elucidar a ontogênese de alguns tecidos secretores, suas funções e composição química dos exsudatos, muitos aliados ao entendimento de diferentes morfologias florais, além da polinização e proteção.

Cacho *et al.* (2010), em seus estudos com os ciátios de *Euphorbia*, observaram que grande parte das inflorescências eram polinizadas por beija-flores, os quais garantiam a polinização devido a presença dos nectários extraflorais conspícuos e posicionados sobre as brácteas, não só acessíveis pela posição em que ocupam, mas também pela recompensa de conteúdo nectarífero. Outros pesquisadores, como Pickard (2008) e Demarco & Carmello-Guerreiro (2011), em análises anatômicas e histoquímicas esclareceram a presença de laticíferos e idioblastos em espécies de Euphorbiaceae, e verificaram que a composição química do látex e das variadas substâncias que podem estar presentes nos idioblastos protegem as plantas contra herbivoria e micro-organismos, além de selar ferimentos.

Estudos corroboram a importância das estruturas secretoras nas diferentes morfologias florais em Euphorbiaceae, no entanto são pouco realizados atualmente, em especial quanto a importância das brácteas nestas variações florais, como Dell & McComb

(1974), Mahlberg *et al.* (1987), Castells *et al.* (1984), Arumugasamy & Inamdar (1988), Nichol & Hall (1988), Arumugasamy *et al.* (1990), Da Cunha *et al.* (1998), entre outros.

O estudo das estruturas secretoras é utilizado não apenas como subsídio na elucidação das diferentes formas florais e proteção, mas também no contexto das relações filogenéticas. Rudall (1987) ao estudar os laticíferos de Euphorbiaceae, propôs uma classificação baseada nos tipos destas estruturas e na presença ou ausência dentre os representantes das subfamílias. Em outro estudo, Rudall (1994) analisou especificamente os laticíferos de Crotonoideae e discutiu possíveis homologias na evolução de Euphorbiaceae.

Considerando o exposto acima, este trabalho tem como objetivo analisar a ontogênese e estrutura das brácteas e glândulas presentes em tipos florais exclusivos de Euphorbiaceae, bem como a relação destas glândulas com a morfologia floral das espécies, sendo os seguintes gêneros selecionados para este trabalho: *Dalechampia* L. (Acalyphoideae), *Joannesia* Vell. (Crotonoideae), *Euphorbia* L. (Euphorbioideae) e *Pera* Mutis (de posição incerta). As espécies de estudo são consideradas inflorescências do tipo pseudanto, exceto *Joannesia*, sendo esta usada como grupo externo na comparação quanto à presença de verticilos e tipos de glândulas.

Materiais e Métodos

Inflorescências contendo flores em diversos estágios de desenvolvimento e estruturas secretoras em diferentes fases de secreção foram coletadas no Jardim do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e no Instituto de Botânica de São Paulo. Material testemunha dos espécimes utilizados foi providenciado e as exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade de São Paulo com os seguintes números: *Euphorbia sipolisii* = K. Gagliardi & D. Demarco – 5 (SPF), *Joannesia princeps* = K. Gagliardi & D. Demarco – 6 (SPF), *Pera glabrata* = K. Gagliardi & D. Demarco – 7 (SPF), *Dalechampia meridionalis* = K. Gagliardi & D. Demarco – 8 (SPF).

Inflorescências contendo flores em fases de botões florais, pré-antese, antese e pós-antese foram isoladas, fixadas em FAA (formalina, ácido acético, álcool etílico 50%) por 24 h (Johansen 1940) e em FNT (formalina neutra tamponada) por 48 h (Lillie 1965), mantidas em bomba de vácuo e estocadas em álcool etílico 70%.

Para análise anatômica e estrutural, o material foi desidratado em série butílica (Johansen 1940), incluído em Paraplast e seccionado transversal e longitudinalmente em micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de astra e safranina (Gerlach 1984)

e montadas em resina sintética, com fotomicrografias obtidas em microscópio de luz Leica DMLB.

Análises micromorfológicas também foram realizadas para a obtenção de maiores detalhes das estruturas secretoras utilizando o material fixado em FAA. Esse material passou por dessecação em ponto crítico, foi metalizado com ouro e analisado em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 940.

Utilizando material fixado em FAA e FNT (Johansen 1940), os seguintes testes histoquímicos foram realizados para análise da composição química dos diferentes exsudatos: vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) para mucilagens ácidas, ácido tânico e cloreto férrico (Pizzolato 1977) para mucilagem, reagente de Lugol (Johansen 1940) para amido, reação PAS (MsManus 1948) para carboidratos, preto de amido B (Fisher 1968) para proteínas, preto de Sudão B (Pearse 1985) e Sudão IV (Pearse 1985) para lipídeos, acetato de cobre e ácido rubeânico (Ganter & Jollés 1969, 1970) para ácidos graxos, cloreto férrico (Johansen 1940) para compostos fenólicos e reagente de Wagner (Furr & Mahlberg 1981) para alcaloides.

Resultados

Brácteas e verticilos estéreis

Os pseudantos de *Dalechampia*, *Euphorbia* e *Pera*, bem como as flores de *Joannesia* contam com um conjunto de brácteas, algumas mais externas às flores, outras associadas mais intimamente a elas, podendo este conjunto ser dividido em subconjuntos de brácteas externas (Figura 1A), bractéolas (Figura 1B), brácteas involucrais (que compõem os involúculos) (Figuras 1A, C e D) e as constituintes do involucelo (Figura 1D e E). As brácteas externas são verdes e as involucrais coloridas em *Euphorbia* (vermelhas) e em *Pera* (amarelas), as quais se apresentam quase que totalmente fechadas. Em *Joannesia* as sépalas são verdes e as pétalas brancas.

As brácteas externas dos pseudantos, as bractéolas de *Joannesia*, as involucrais e as do involucelo de *Dalechampia* e *Pera* são anatomicamente muito similares quando totalmente formadas, diferindo especialmente quanto ao número de camadas do mesofilo. Estas estruturas apresentam epiderme de ambas as faces unisseriada, com indumento da face abaxial composto por tricomas tectores, unicelulares, alongados e lignificados e

também tricomas urticantes (Figuras 1F), sob forma de escamas em *Pera* (Figuras 1G). A epiderme da face adaxial é glabra.

O mesofilo das brácteas é homogêneo e composto por camadas de células parenquimáticas clorofilianas arredondadas a isodiamétricas de tamanhos variados, sendo possível observar muitos idioblastos cristalíferos contendo drusas, especialmente em *Dalechampia* e *Joannesia* e muitos compostos fenólicos em *Pera* (Figuras 1G). Os feixes vasculares são colaterais (Figuras 1G). Em secção transversal, destacam-se as nervuras central, secundárias e terciárias das brácteas involucrais de *Dalechampia* devido às suas grandes dimensões em relação ao limbo (Figura 1H). Com os pseudantos maduros, as brácteas externas estão às vezes ausentes, as involucrais totalmente abertas, exceto em *Pera* (Figura 1I), e as do involucelo às vezes presentes.

As flores de *Dalechampia* e *Joannesia* apresentam perianto, sendo este muito similar nas flores estaminadas e pistiladas, composto por sépalas glabras em *Dalechampia* (Figura 1J) e com indumento tricomatoso em *Joannesia*, com epiderme de ambas as faces unisseriada e papilosa em *Joannesia* (Figura 1K). O mesofilo é homogêneo, ocorrendo feixes vasculares colaterais nas regiões de nervura, idioblastos com conteúdo fenólico e cordões de laticíferos anastomosados ao longo da sépala de *Joannesia* (Figura 1K). As pétalas das flores de *Joannesia* apresentam anatomia similar à das sépalas, tendo como diferencial número de traços foliares e maior número de camada do mesofilo (Figura 1K).

As diferentes morfologias florais estudadas apresentam estruturas secretoras comuns entre elas, como os coléteres e idioblastos, no entanto também contam com estruturas específicas, como a glândula de resina para *Dalechampia* (Figura 1E) e os nectários (Figura 1C) e laticíferos para *Euphorbia* e *Joannesia*. Embora particulares para cada pseudanto, estas estruturas desempenham de maneira geral funções semelhantes, podendo então ser incorporadas e analisadas em dois grupos: as glândulas de proteção às flores ou primórdios florais, incluindo laticíferos, coléteres e também idioblastos, e as estruturas relacionadas à polinização, como a glândula de resina e os nectários, compreendidos como glândulas nupciais.

Laticíferos, coléteres e idioblastos secretores

Em fase inicial de desenvolvimento das inflorescências, próximo ao ápice caulinar, as estruturas secretoras encontradas nas espécies são os laticíferos, presentes em *Joannesia*

(Figura 2A e B) e *Euphorbia* (Figura 2C-E), os coléteres em *Dalechampia* e *Euphorbia* (Figura 2D, H-K) e idioblastos secretores em *Joannesia* e *Pera* (Figura 2B, F e G).

Os laticíferos se estendem por todos os órgãos, nos tecidos fundamentais e vasculares, facilmente observáveis no mesofilo das sépalas e pétalas de *Joannesia* (Figura 2A e B) e nas brácteas externas do ciátio de *Euphorbia* (Figura 2C), sendo fortemente coradas em azul com paredes mais espessas do que as das células parenquimáticas, apresentando formatos alongados e de maneira geral agrupados (Figura 2C).

Ainda em fase muito jovem de desenvolvimento, os laticíferos são as primeiras estruturas a se tornarem diferenciadas, sendo que as primeiras modificações ocorrem na fusão de células iniciais que estão em contato formando uma fileira (Figura 2F). Posteriormente, ocorre o alongamento deste conjunto aliado à dissolução das paredes terminais das células que compõem o laticífero, classificando-o como articulado anastomosado (Figuras 2B-E).

Os idioblastos secretores, presentes em abundância desde os primórdios florais de *Pera* e *Joannesia*, são formados especialmente nas brácteas involucrais, sépalas, pétalas e receptáculo (Figura 2B, F e G). Apresentam-se como células isoladas, de paredes mais espessas que as demais células parenquimáticas, normalmente em grupos e com coloração diferenciada. Com o desenvolvimento das flores, os agrupamentos de idioblastos se tornam mais volumosos e sua pigmentação mais intensa. Em ambas as espécies, os idioblastos fenólicos estão presentes em abundância nas regiões de conectivo das anteras e em *Pera*, encontram-se também nos tricomas em forma de escamas que compõem o indumento das brácteas involucrais (Figuras 2F e G).

Os coléteres são encontrados em grandes quantidades nas regiões meristemáticas e entre brácteas em *Euphorbia* (Figuras 2H e I e 3B) e também no ápice das brácteas externas de *Dalechampia* (Figura 2K), além de ocorrerem no ápice das sépalas das flores pistiladas (Figura 2J), não sendo observados em *Joannesia* e em *Pera*.

Os coléteres são encontrados em diferentes fases de desenvolvimento. Em fase inicial dos pseudantos em que são encontrados, os coléteres apresentam-se em formação, sendo que nas regiões meristemáticas formadoras destas glândulas, muitos laticíferos já se encontram diferenciados, no caso de *Euphorbia* e *Joannesia* (Figura 2D, E, H). As regiões meristemáticas das quais se formam os coléteres localizam-se próximo às axilas das brácteas (Figura 2E, 3A e B), às vezes no ápice destas, ou também no ápice das sépalas das flores pistiladas de *Dalechampia*.

A formação ocorre a partir de divisões das células meristemáticas formando estruturas circulares (Figura 2E). Com as divisões celulares anticlinais da protoderme e divisões em variados planos das células internas, tem-se o desenvolvimento desta estrutura que se torna mais alongada e com células epidérmicas levemente alongadas radialmente e células internas de formatos variados (Figura 2H). Nesta fase ainda muito jovem de desenvolvimento dos pseudantos, os coléteres estão em fase pré-secretora.

Os coléteres de *Dalechampia* apresentam pedúnculo mais alongado do que os de *Euphorbia*. O pedúnculo destes coléteres origina-se a partir de divisões celulares em variados planos, concomitantemente a formação da porção secretora destas glândulas.

Com o desenvolvimento dos pseudantos, os coléteres também apresentam modificações passando a apresentar epiderme em paliçada, citoplasma com aspecto denso e fortemente corado com núcleo posicionado em uma das extremidades, sendo este conjunto de características anatômicas relacionada a fase secretora destas glândulas (Figuras 2I e J e 3C-F).

Em *Euphorbia*, os coléteres se localizam agrupados nas axilas das brácteas (Figuras 2I, 3B-E), estando os mais basais em fase pré-secretora, os intermediários em fases secretoras e os mais apicais em fase pós-secretora.

Na fase final de desenvolvimento dos pseudantos, com algumas flores já senescentes, alguns coléteres são observados em fase pós-secretora, apresentando células epidérmicas azuladas, citoplasma hialino e núcleos pequenos (Figuras 2I, 3F). Em *Dalechampia*, os coléteres são caducos e caem à medida que as flores se desenvolvem, sendo estas glândulas permanentes em *Euphorbia* e adquirem aspecto necrosado com o desenvolvimento das flores.

Glândula de resina e Nectários

Diferentemente das glândulas descritas acima, a glândula de resina e os nectários apresentam funções relacionadas à polinização, atuando na recompensa aos polinizadores através de substâncias secretadas.

Glândula de resina formada por diversas brácteas glandulares foi encontrada no pseudanto de *Dalechampia*. Ela inicia sua formação a partir de divisões celulares da região meristemática lateral do eixo da inflorescência, localizando-se inicialmente entre os primórdios de flores estaminadas e o pedúnculo do pseudanto (Figura 4A e D). Nesta região, as células passam por divisões celulares em variados planos e formam novas

camadas e aglomerados de células. Estas, em contínua divisão celular, formam novas brácteas em torno do pedúnculo, posicionando-se umas sobre as outras.

Em fase inicial, estas apresentam epiderme da face adaxial e abaxial unisseriada, não papilosa, composta por células pequenas e cuboides, mesofilo homogêneo com células parenquimáticas pequenas, de formatos variados e espaços intercelulares inconspícuos. A bráctea mais apical deste conjunto mantém uma porção central de células meristemáticas e a glândula como um todo ainda se encontra em fase pré-secretora (Figura 4B e C).

Quando as flores estaminadas estão em pré-antese, as brácteas continuam arranjadas umas sobre as outras, no entanto as células da epiderme da face abaxial iniciam processo de alongamento radial, tornando-se levemente paliçadas, com citoplasma de aspecto denso, porém com coloração não tão intensa. O mesofilo se mantém homogêneo com muitas camadas de células parenquimáticas, de paredes finas, tamanhos e formatos variados, núcleos e conteúdo citoplasmático fortemente corado, além de feixes vasculares colaterais diferenciados (Figura 4E). Estas características anatômicas são transitórias entre a fase pré-secretora e secretora da glândula.

Com o desenvolvimento do pseudanto, algumas flores estaminadas se encontram em antese e outras ainda em pré-antese, no entanto a inflorescência pistilada está totalmente desenvolvida e é entre estas fases florais que as brácteas se tornam totalmente modificadas e adquirem características da fase secretora, com ambas as epidermes em paliçada, conteúdo denso e fortemente corado (Figuras 4F-I).

A glândula de resina se mantém secretora durante todo o desenvolvimento do pseudanto, e apenas após a senescência de praticamente todas as flores, passa para a fase pós-secretora (Figuras 4J e K).

Nectários estão presentes no pseudanto de *Euphorbia* e nas flores de *Joannesia* e (Figuras 5A e B). Estes iniciam sua formação a partir de divisões celulares das regiões meristemáticas do ápice das brácteas involucrais do ciátio (Figura 5A) e ao redor do ovário em *Joannesia* (Figura 5B). Com as divisões celulares, tem-se inicialmente uma estrutura de formato levemente alongado, com uma das extremidades mais arredondada (Figura 5C). Nesta estrutura, ocorrem apenas células meristemáticas em divisão, com uma protoderme delimitando a estrutura, cujas células são pequenas, arredondadas, com núcleos grandes ocupando quase todo o lume celular (Figura 5D). As células centrais também são meristemáticas e apresentam descrição anatômica similar as da protoderme, sendo menos coradas e também em atividade mitótica, estando o nectário em fase pré-secretora (Figura 5C e D).

Com o desenvolvimento do pseudanto e completa formação do invólucro, assim como o desenvolvimento das flores de *Joannesia*, os nectários passam por modificações características da fase pré-secretora (Figuras 5E-H). Nesta, as células se diferenciam e ocorre uma mudança de formato do nectário (Figura 5E), se tornando curvo, arredondado em uma das extremidades e mais alongado na outra, apresentando nesta fase um leve aspecto de taça em *Euphorbia* (Figura 5E e G) e se tornando cilíndrico em *Joannesia* (Figura 5F e H). Nesta etapa, as células epidérmicas são levemente paliçádicas em *Euphorbia* e arredondadas a levemente cuboides em *Joannesia* com conteúdo relativamente denso e as células parenquimáticas adjacentes à epiderme também são mais fortemente coradas (Figuras 5H).

Em desenvolvimento quase que completo, os nectários se tornam mais curvos na porção apical-mediana e adquirem o formato de taça no ciátio (Figuras 5I e K) e se tornam cilíndricos em *Joannesia* (Figura 5M-P), sendo que nesta fase as características do estágio secretor se tornam conspícuas em *Euphorbia*, com epiderme unisseriada totalmente em paliçada com algumas reentrâncias (Figura 5J e L), cujas células possuem paredes finas e conteúdo de aspecto denso e núcleos posicionados nas extremidades basais das células. Logo abaixo da epiderme em paliçada, observa-se um parênquima secretor, composto por quatro camadas de células com paredes finas e conteúdo citoplasmático de aspecto denso (Figura 5L).

O nectário de ambas as espécies é vascularizado por xilema e floema, sendo observados também alguns laticíferos. Para a liberação da secreção, não ocorre rompimento celular, sendo que em *Joannesia* a secreção provavelmente é liberada por estômatos já que a epiderme secretora é registrada apenas em *Euphorbia*.

Logo abaixo do parênquima secretor, pode-se observar parênquima clorofiliano e ainda mais abaixo deste, uma intensa rede vascular (Figura 5L e O).

Em fase madura, quando as flores pistiladas iniciam suas transformações em fruto e as flores estaminadas encontram-se na maioria em antese, os nectários mantêm a fase secretora com as mesmas características anatômicas supramencionadas, atingindo a fase pós-secretora provavelmente com a senescência de todas as flores, já em fase de fruto.

Histoquímica das glândulas

Os laticíferos de *E. sipolisii* e *J. princeps* apresentaram-se como produtores de látex de composição muito variada, dentre compostos hidrofílicos, como mucilagem (Figuras

6A-C), e também proteínas (Figuras 6D, E). Contudo, o principal componente do látex é lipofílico, com concentrações detectáveis de lipídeos (Figuras 6F, G), compostos fenólicos (Figura 6H) e ácidos graxos apenas no látex de *Joannesia* (Figura 5I).

Os idioblastos encontrados amplamente no mesofilo das brácteas, verticilos estéreis das flores e regiões de conectivos das anteras também foram analisados quimicamente e observou-se que estas células compostos fenólicos lipofílicos (Figuras 6J-O)

A glândula de resina de *Dalechampia meridionalis*, assim registrada na literatura, foi também corroborada em nossos testes apresentando unicamente compostos lipofílicos, a glândula conta com quantidade expressiva de lipídeos (Figuras 7A-D), sendo estes de cadeias longas, ácidos graxos (Figura 7E), também ocorrendo compostos fenólicos lipofílicos (Figura 7F).

A detecção de glicose nos nectários de *E. sipolisii* e *J. princeps* foi obtida através de teste com glicofita. Além da glicose, outros compostos foram detectados em menores concentrações, tais como mucilagem (Figuras 7G-I) e amido (Figura 7J).

FIGURAS

Figura 1. Brácteas e verticilos estéreis das flores e pseudantos. **Fig 1A.** Pseudanto de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. **Fig 1B.** Flor estaminada de *Joannesia princeps* Vell. **Fig 1C.** Pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br.com nectários conspícuos (seta). **Fig 1D.** Pseudanto estaminado de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill com involúcro aberto para melhor demonstração (2mm). **Fig 1E.** Pseudanto de *Dalechampia*, com involúcro removido, involucelo e flores em evidência. Note a glândula de resina (*asterisco*). **Fig 1F.** Fase meristemática do pseudanto de *Dalechampia* em vista longitudinal (200 µm). **Fig 1G.** Bráctea involucral do pseudanto estaminado de *Pera*, evidenciando os tricomas em forma de escamas e mesofilo (100 µm). **Fig 1H.** Pseudanto jovem de *Dalechampia* em vista transversal (200 µm). **Fig 1I.** Brácteas involucrais semiabertas do pseudanto estaminado de *Pera* (100 µm). **Fig 1J.** Pseudanto de *Dalechampia* em vista longitudinal com flores em botão floral e sépalas já formadas (200 µm). **Fig 1K.** Sépala e pétala de *Joannesia* (100 µm).

Figura 2. Laticíferos, coléteres e idioblastos secretores. **Fig 2A.** Fase meristemática de flor de *Joannesia princeps* Vell. demonstrando a formação de laticíferos (seta) (100µm). **Fig 2B.** Fase meristemática de flor de *Joannesia* com verticilos em desenvolvimento, laticíferos (seta) e idioblastos secretores (seta fina) em formação (100µm). **Fig 2C.** Região meristemática e brácteas externas do pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. com laticíferos em formação (50µm). **Fig 2D.** Região de axila da bráctea e coléter em fase pré-secretora de *Euphorbia* (100µm). **Fig 2E.** Laticíferos diferenciados, articulados anastomosados de *Euphorbia* (100µm). **Fig 2F.** Fase inicial de desenvolvimento de pseudanto de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill., sendo conspícuos os tricomas em forma de escamas (seta) (200µm). **Fig 2G.** Antera de *Pera* evidenciando região do conectivo com muitos idioblastos secretores (200µm). **Fig 2H.** Coléteres de *Euphorbia* em divisão celular e em fase secretora (50µm). **Fig 2I.** Coléteres na axila da bráctea de *Euphorbia*, alguns em fase secretora e outros em posição mais apical, já em fase pós-secretora (500µm). **Fig 2J.** Coléter no ápice da bráctea externa de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg., em fase pós-secretora (50µm). **Fig 2K.** Coléter no ápice da sépala de flor pistilada de *Dalechampia*, também em fase pós-secretora (100µm).

Figura 3. Coléteres do pseudanto de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. em microscopia eletrônica de varredura. **Fig 3A.** Coléteres em formação ainda no início do desenvolvimento do pseudanto (100µm). **Fig 3B.** Pseudanto jovem com conjunto de coléteres nas axilas das brácteas externas (1mm). **Fig 3C.** Detalhes dos coléteres agrupados iniciando secreção, cujo aspecto é enrugado e branco (200µm). **Fig 3D.** Pseudanto em desenvolvimento e destaque para o conjunto de coléteres em várias fases de secreção, na axila da bráctea (500µm). **Fig 3E.** Detalhe para os coléteres em várias fases de secreção, sendo um deles com aspecto secretor, devido às paredes em paliçada (100µm). **Fig 3F.** Detalhe para coléteres entrando em fase pós-secretora, com células epidérmicas de paredes finas e de aspecto vazio (50µm). (co = coléteres).

Figura 4. Ontogênese da glândula de resina de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. **Fig 4A.** Pseudanto em estágio muito jovem de desenvolvimento e brácteas iniciando formação para a futura glândula de resina (seta) (200µm). **Fig 4B.** Pseudanto em fase jovem, flores em botão floral e brácteas mais desenvolvidas e agrupadas (seta), caracterizando a glândula de resina em fase pré-secretora (500µm). **Fig 4C.** Detalhe para as brácteas da glândula que mantém porção meristemática (100µm). **Fig 4D.** Pseudanto jovem com destaque para a glândula de resina ainda não totalmente formada (*asterisco*) (200µm). **Fig 4E.** Brácteas diferenciadas e glândula de resina em estágio pré-secretor com transformações para a próxima fase (100µm). **Fig 4F.** Glândula de resina em fase secretora (500µm). **Fig 4G.** Detalhe para as brácteas modificadas e secretoras da glândula, com epiderme paliçádica e mesofilo vascularizado (100µm). **Fig 4H.** Pseudanto desenvolvido com glândula de resina totalmente formada (500µm). **Fig 4I.** Detalhe para o arranjo das brácteas na constituição da glândula de resina em fase secretora (200µm). **Fig 4J.** Pseudanto maduro com muitas flores já senescentes e glândula de resina iniciando fase pós-secretora (1mm). **Fig 4K.** Detalhe para a glândula de resina com brácteas em aspecto enrugado, caracterizando fase pós-secretora (200µm).

Figura 5. Ontogênese dos nectários de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. e *Joannesia princeps* Vell. **Fig 5A.** Pseudanto de *Euphorbia* em estágio jovem com involúcro em formação e nectário em estágio inicial (seta) (200µm). **Fig 5B.** Flor pistilada de *Joannesia* em estágio muito jovem de desenvolvimento e nectários em formação (200µm). **Fig 5C.** Detalhe para o nectário de *Euphorbia* em fase pré-secretora (50µm). **Fig 5D.** Detalhe para o nectário de *Joannesia* em fase pré-secretora (50µm). **Fig 5E.** Detalhe do nectário de *Euphorbia* já formado e jovem, adquirindo formato de taça (100µm). **Fig 5F.** Vista longitudinal dos nectários de *Joannesia* adquirindo formato cilíndrico (500µm). **Fig 5G.** Vista longitudinal do pseudanto de *Euphorbia* com mudança de formato dos nectários ainda em fase pré-secretora. **Fig 5H.** Vista longitudinal do nectário de *Joannesia* em formato cilíndrico e com características de fase pré-secretora (200µm). **Fig 5I.** Detalhe do nectário de *Euphorbia* em fase secretora, em pseudanto já maduro (500µm). **Fig 5J.** Detalhe de corte longitudinal do nectário de *Euphorbia* em fase secretora do pseudanto maduro, evidenciando células paliçádicas e reentrâncias na superfície (seta) (100µm). **Fig 5K.** Detalhe para o nectário de *Euphorbia* em fase secretora, com epiderme paliçada, parênquima secretor fortemente corado abaixo desta e intensa rede vascular (200µm). **Fig 5L.** Detalhe da porção apical do nectário de *Euphorbia*, com epiderme paliçada, parênquima secretor e clorofiliano e alcance de tecidos vasculares (100µm). **Fig 5M.** Nectários de *Joannesia* totalmente formados e em fase secretora (500µm). **Fig 5N.** Detalhe do nectário de *Joannesia* com formato cilíndrico e muitos tricomas (200µm). **Fig 5O.** Vista longitudinal do nectário de *Joannesia* em fase secretora (200µm). **Fig 5P.** Detalhe do nectário de *Joannesia* em fase secretora com epiderme de células não paliçádicas (100µm).

Figura 6. Histoquímica dos laticíferos, coléteres e idioblastos secretores. **Fig 6A.** Teste com vermelho de rutênio indicando presença de mucilagem em laticíferos de *Joannesia princeps* Vell. (50µm). **Fig 6B.** Teste com vermelho de rutênio indicando presença de mucilagem em laticíferos de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. (seta) (50µm). **Fig 6C.** Teste com reação PAS indicando presença de glicose em laticífero de *Joannesia* (50µm). **Fig 6D.** Teste com preto de amido B indicando o resultado positivo de proteínas nos laticíferos de *Euphorbia* (seta) (50µm). **Fig 6E.** Teste com preto de amido B indicando o resultado positivo de proteínas nos laticíferos de *Joannesia* (50µm). **Fig 6F.** Teste com sudam black indicando a presença de lipídeos nos laticíferos de *Joannesia* (50µm). **Fig 6G.** Teste com sudam IV indicando a presença de lipídeos nos laticíferos de *Joannesia* (seta) (100µm). **Fig 6H.** Teste com cloreto férrico indicando o resultado positivo para compostos fenólicos nos laticíferos de *Euphorbia* (seta) (50µm). **Fig 6I.** Teste para ácido rubeânico demonstrando presença de ácido graxo em laticíferos de *Joannesia* (50µm). **Fig 6J.** Teste para azul de anilina demonstrando resultado positivo para lipídeos nos idioblastos secretores de *Joannesia* (100µm). **Fig 6K.** Teste para sudam black demonstrando resultado positivo para lipídeos nos idioblastos secretores de *Joannesia* (50µm). **Fig 6L.** Teste para sudam black demonstrando resultado positivo para lipídeos nos idioblastos secretores da região do conectivo das anteras de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (100µm). **Fig 6M.** Teste para sudam IV demonstrando resultado positivo para lipídeos nos idioblastos secretores de *Joannesia* (50µm). **Fig 6N.** Teste para sudam IV demonstrando resultado positivo para lipídeos nos idioblastos secretores da região do conectivo das anteras de *Pera* (200µm). **Fig 6O.** Teste para Cloreto Férrico demonstrando compostos fenólicos nos idioblastos secretores presentes no receptáculo do pseudanto de *Pera* (100µm). **Fig 6P.** Teste com preto de amido B demonstrando presença de proteínas nos idioblastos secretores de *Joannesia* (100µm).

Figura 7. Histoquímica da glândula de resina e dos nectários. **Fig 7A.** Teste para azul do nilo demonstrando a presença de lipídeos na glândula de *Dalechampia meridionalis* Müll. Arg. (100µm). **Fig 7B.** Detalhe do teste para azul do nilo demonstrando a presença de lipídeos na glândula de *Dalechampia* (seta) (50µm). **Fig 7C.** Teste com sudan black destacando resultado positivo para lipídeos na glândula de *Dalechampia* (200µm). **Fig 7D.** Detalhe do teste para sudan black demonstrando a presença de lipídeos na glândula de *Dalechampia* (seta) (50µm). **Fig 7E.** Teste com reagente de Wagner demonstrando resultado positivo para ácidos graxos (seta) (50µm). **Fig 7F.** Teste com cloreto férrico demonstrando presença de compostos fenólicos na glândula de *Dalechampia* (seta) (50µm). **Fig 7G.** Teste com vermelho de rutênio identificando a presença de mucilagem no nectário de *Euphorbia sipolisii* N.E. Br. (200µm). **Fig 7H.** Detalhe do nectário de *Euphorbia* e da identificação de mucilagem (seta) (100µm). **Fig 7I.** Teste de vermelho de rutênio identificando a presença de mucilagem no nectário de *Joannesia princeps* Vell. (50µm). **Fig 7J.** Teste com Lugol identificando a presença de amido no nectário de *Euphorbia* (seta) (50µm).

Discussão

Brácteas e glândulas de proteção

As brácteas são de grande importância na proteção das estruturas reprodutivas, bem como na atração aos polinizadores, tendo como características colorações intensas, como o vermelho do involúcro do pseudanto de *Euphorbia* e o amarelo de *Pera*, sendo estas análogas às pétalas de *Joannesia*, de coloração branco-amarelada, as quais também atuam na atração aos polinizadores.

Aliado às brácteas e aos verticilos estéreis, estruturas secretoras também apresentam função na proteção dos primórdios florais, como os coléteres, laticíferos e idioblastos fenólicos, presentes em todas as fases de desenvolvimento das flores, especialmente nas brácteas e verticilos estéreis.

Os laticíferos presentes em *Euphorbia* e *Joannesia* são articulados anastomosados, pois logo em estágio muito jovem, pode-se verificar a fusão de células, que se diferenciam e se alongam. Estas, mesmo alongadas continuam se fundindo, formando uma longa estrutura tubular anastomosada ao longo de todas as peças florais.

Para a classificação de laticíferos, consideram-se dois grandes grupos: não articulados e articulados. Conforme proposto por Fahn (1979), esta classificação não tem relação com grupos taxonômicos e, portanto, diferentes tipos de laticíferos podem ser encontrados em espécies diferentes de uma mesma família. Para Hagel *et al.* (2008), existem tipos predominantes de laticíferos em determinadas ordens, sendo que para Euphorbiales (atualmente Malpighiales), o tipo predominante é o não articulado e ramificado, embora o tipo articulado já tenha sido documentado.

Em análise mais aprofundada, especificamente da morfologia dos grãos de amido do látex, Biesboer & Mahlberg (1981) propuseram que os laticíferos primitivos de *Euphorbia* provavelmente ocorreram como pequenas células individuais que, nos grupos primitivos, passaram por limitados processos de alongamento celular na formação de pequenos laticíferos não articulados e não ramificados. Estes autores complementam que a subsequente evolução e modificação destes laticíferos resultaram no desenvolvimento de células mais alongadas e de novos tipos de laticíferos, filogeneticamente mais derivados.

Rudall (1987) aprofundou os conhecimentos dos tipos de laticíferos e propôs relações e hipóteses evolutivas dentro das subfamílias de Euphorbiaceae, sugerindo que as similaridades morfológicas e químicas dos laticíferos já estudados na literatura, dentre os

não articulados e os articulados, indicam ancestrais comuns para estas estruturas secretoras em Euphorbiaceae, já que ambos os tipos demonstram capacidade de crescimento intrusivo entre as células vizinhas.

Dentre as subfamílias, Rudall (1987) estabelece ainda que nas espécies de Acalyphoideae os laticíferos são em sua maioria ausentes, em Crotonoideae são presentes na maioria e em Euphorbioideae estão presentes em todos os representantes, características que fornecem a autora outra hipótese, a qual os laticíferos evoluíram provavelmente em algum traço evolutivo entre Acalyphoideae e Crotonoideae, as duas consideradas basais em relação à Euphorbioideae.

Além dos laticíferos, os coléteres e os idioblastos atuam de forma semelhante na proteção dos primórdios florais. Alguns coléteres permanecem ao longo do desenvolvimento do pseudanto e outros se tornam caducos, como os presentes no cálice das flores pistiladas de *Dalechampia*, já os idioblastos mantêm-se presentes em todas as fases de desenvolvimento de *Pera* e *Joannesia*.

Diferentemente da vasta literatura registrada para laticíferos, os coléteres e idioblastos fenólicos são pouco registrados para Euphorbiaceae. Os coléteres são glândulas multicelulares caracterizadas pela produção de secreção composta por mucilagem, terpenos ou uma mistura de ambos, secreção esta similar a dos idioblastos, com a diferença de que estes são estruturas unicelulares, organizadas em grupos (Fahn 1989, 1990).

Nas espécies em estudo, os coléteres foram observados nas brácteas e no cálice das flores e apresentam formatos diferentes, sendo os de *Dalechampia* caracterizados por um pedúnculo longo e uma cabeça secretora levemente arredondada e oval e o de *Euphorbia* composto por pedúnculo curto e inconspícuo, com porção basal achatada. Thomas (1991) classificou os coléteres como dos tipos padrão, dendroide ou “brush-like”, sendo o primeiro tipo característico de *Euphorbia* e *Dalechampia*, também registrado para Apocynaceae.

Devido à escassa literatura a respeito destas estruturas em Euphorbiaceae e com base nos poucos estudos registrados também para ontogênese dos pseudantos, pode-se inferir que estas estruturas são até o momento desconhecidas para a família e que pela importante função de proteção e secreção de mucilagem e terpenos, é considerada fundamental para o desenvolvimento de formas florais tão variadas como os pseudantos de *Dalechampia*, *Euphorbia* e *Pera* e também das flores de *Joannesia*.

Glândulas nupciais

As glândulas nupciais estão intimamente relacionadas à polinização e por consequência, às formas florais, sendo estas representadas nas espécies estudadas pela glândula de resina em *Dalechampia* e pelos nectários em *Euphorbia* e *Joannesia*.

A glândula de resina relatada aqui tem características muito distintas dentre as estruturas secretoras já estudadas e aparentemente específicas para o gênero *Dalechampia*, sendo ela muito semelhante anatomicamente às brácteas e aos verticilos das flores analisadas.

Em *Dalechampia*, conforme descrito anatomicamente, o desenvolvimento da glândula se dá com a formação de conjuntos de brácteas através de divisões celulares de regiões meristemáticas nas regiões apicais e laterais do pedúnculo da inflorescência, sendo concomitantemente ao desenvolvimento do pseudanto, de divisões celulares as células passam por diferenciação e as brácteas se modificam alcançando a fase secretora. Baseado em nossos resultados, poderíamos interpretar esta glândula tão única como um conjunto de brácteas modificadas para secreção. Sobre outra interpretação, poderíamos também inferir que esta glândula nada mais é do que um involucelo secretor de conteúdo lipídico, já que assim como as outras brácteas do involucelo, estas também estão em contato com a inflorescência estaminada.

A literatura registra poucos estudos anatômicos sobre estas glândulas em Euphorbiaceae, destacando estudos taxonômicos que apresentam a descrição morfológica. Webster (1991) estabeleceu que para as espécies do gênero consideradas mais derivadas, como *D. scandens*, seção *Dalechampia*, as glândulas resiníferas são estruturas laminares com epitélio secretor. Para representantes da seção *Cremophyllum*, esta estrutura glandular apresenta as extremidades como projeções, que possivelmente produz compostos aromáticos ao invés de resina.

Em estudo anatômico, Souza *et al.* (2010) descreveu a glândula resinífera de *D. stipulacea* como componente da inflorescência intermediária estaminada, tendo como principal característica a produção de resina como recompensa para os insetos visitantes. Em estudo de biologia floral, Sazima *et al.* (1985) estabeleceu que as abelhas do gênero *Euglossa* são as principais visitantes das inflorescências de *D. stipulacea* e são consideradas os polinizadores mais efetivos desta espécie.

De forma similar à glândula de *D. meridionalis*, os nectários de *Euphorbia* e *Joannesia* são eficientes na atração dos polinizadores e ao contrário das glândulas de resina,

cuja literatura é escassa, muitos estudos anatômicos são realizados com o objetivo de entender ontogeneticamente e evolutivamente o desenvolvimento destas importantes glândulas.

Em *Euphorbia*, verificou-se que os nectários florais posicionam-se sobre as brácteas e iniciam desenvolvimento logo no início da formação do involúcro, cujas modificações em fase secretora se mantêm inclusive após o amadurecimento da flor pistilada, características verificadas também para as flores de *Joannesia*, cuja formação dos nectários florais se dá concomitantemente à formação do androceu e gineceu.

A composição química do néctar de *Euphorbia* e *Joannesia* se demonstrou muito similar, e assim podemos supor que a morfologia e posição dos nectários poderia estar sendo de maior influência na atração dos polinizadores. Fahn (2000) afirmou que nectários extraflorais podem ser volumosos ao se posicionarem em superfícies da flor, podem ser protuberantes ou ainda inclusos, de forma que os dois primeiros tipos são os mais atrativos e garantem maior eficiência na polinização, como verificado para os nectários florais das espécies em estudo, destacando que *Euphorbia* é gênero mais representativo em número de espécies da família, podendo toda esta representatividade ser atribuída em partes a estrutura dos nectários.

Anatomicamente, diversos pesquisadores analisaram nectários de Euphorbiaceae (Arumugasamy & Inamdar 1988; Jose & Inamdar 1988; Arumugasamy *et al.* 1990), e constataram que assim como em *E. sipolisii*, os nectários são estruturalmente compostos por 3 conjuntos de tecidos, a epiderme paliçádica secretora, ausente em *Joannesia*, o parênquima nectarífero também secretor e os tecidos vasculares. Esta caracterização anatômica aliada a morfologia dos nectários é discutida por estes autores como evolutivamente derivada se comparada com os nectários nupciais de outros grupos e outras inflorescências.

Diferentemente de outras espécies de Euphorbiaceae, como em espécies de *Croton* e *Astraea*, as quais apresentam flores com discos nectaríferos e nectários livres (De Paula *et al.* 2011) similares aos registrados para *J. princeps*, os nectários de *E. sipolisii*, juntamente com os registrados para outras espécies de *Euphorbia* apresentam maior complexidade e organização anatômica, bem como tipo morfológico que pode estar aliado a diferentes síndromes de polinização.

Conclusões

O conjunto de brácteas verificado para as flores está relacionado à funções distintas, como proteção, executada pelas brácteas do involúcro e involucelo de *Dalechampia*, e atração, como as brácteas do involúcro de *Euphorbia*, *Pera* e as pétalas de *Joannesia*.

As estruturas secretoras aqui analisadas, tanto as de proteção, como laticíferos, coléteres e idioblastos, quanto as nupciais, glândula de resina e dos nectários, atuam em fases distintas do desenvolvimento dos pseudantos, podendo-se assumir que são importantes para o desenvolvimento completo das inflorescências e flores.

As espécies analisadas são pertencentes a subfamílias filogeneticamente distintas, estando as estruturas secretoras possivelmente relacionadas a variação morfológica e à história evolutiva do grupo, contribuindo nas diferentes síndromes de polinização.

As análises histoquímicas corroboram as afirmações sobre a glândula de resina de *Dalechampia* e também sobre a natureza das glândulas das demais espécies, sendo possível sugerir que as estruturas secretoras estão relacionadas à coevolução dos pseudantos devido às suas diferentes morfologias, exercendo diferentes funções ao longo da ontogênese floral.

Referências

- Arumugasamy, K; Inamdar, J. A. (1988). **A developmental study on the cyathial nectaries in *Euphorbia thymifolia* L.** Acta Societatis Botanicorum Poloniae. v. 57 (2), p. 223 – 227.
- Arumugasamy, K; Subramanian, R. B; Inamdar, J. A. (1990). **Structure, ontogeny and histochemistry of cyathial nectaries in *Euphorbia heterophylla* L. (Euphorbiaceae).** Acta Societatis Botanicorum Poloniae. v. 59 (1-4), p. 3-8.
- Biesboer, D. D; Mahlberg, P. G. (1981). **Laticifer starch grain morphology and laticifer evolution in *Euphorbia* (Euphorbiaceae).** Nordic Journal of Botany. v. 1 (3), p. 447 – 457.
- Cacho, N. I; Berry, P. E; Olson, M. E; Steinmann V.W; Baum, D. A. (2010). **Are spurred cyathia a key innovation? Molecular systematics and trait evolution in the slipper spurge (Pedilanthus clade: *Euphorbia*, Euphorbiaceae).** American Journal of Botany. v. 97 (3), p. 493-510.
- Castells, A. R. C; Ormond, W. T; Braconi, A. (1984). **Contribuição ao estudo da biologia de *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) – I – laticíferos e glândulas.** Revista Brasileira de Biologia. v. 44 (2), p. 149 – 158.

Cluter, D. F; Botha, T; Stevenson, D. W. (2007). **Plant Anatomy: an applied approach**. Ed. Blackwell, Oxford.

Da Cunha, M. Costa, C. G; Machado, R. D; Miguens, F. C. (1998). **Distribution and differentiation of the laticifer system in Chamaesyce thymifolia (L.) Millsp. (Euphorbiaceae)**. Acta Bot. Neerl. v. 47 (2), p. 209 – 218.

Dell, B; McComb, A. J. (1974). **Resin production and Glandular hairs in *Beyeria viscosa* (Lalill.) Miq. (Euphorbiaceae)**. Australian Botanical Journal. v. 25 (1), p. 195-210.

De-Paula, O.C. **Morfologia e Desenvolvimento Floral em *Croton* L. e *Astraea KLOTZSCH* (Euphorbiaceae sensu stricto)**. (2010). Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

Demarco, D; Carmello-Guerreiro, S. M. (2011). **Pericarp Ontogeny and histochemistry of the exotesta and pseudocaruncle of *Euphorbia milli* (Euphorbiaceae)**. Rodriguésia. v. 62 (3), p. 477 – 489.

Fahn, A. (1990). **Plant anatomy**. Ed. Pergamon Press, Oxford.

Fahn, A. (1979). **Secretory tissues in plants**. Ed. Academic press, London.

Fahn, A. (2000). **Structure and function of secretory cells**. Advances in Botanical Research. v.31 (1), p. 37-75.

Freitas, J. R; Figueiredo, R. A; Nadai, I. C & Hardman, L. (2011). **Aspectos da ecologia reprodutiva de *Pera glabrata* (Schott) Poepp. ex Baill. (EUPHORBIACEAE) em uma área de cerrado no estado de São Paulo**. Revista Árvore. v.35 (6), p.1227-1234.

Fisher, D.B. (1968). **Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy**. Histochemie. v. 16, p. 92-96.

Furr, M & Mahlberg, P. G. (1981). **Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa***. Journal of Natural Products. v. 44, p. 153-159.

Ganter, P & Jollés, G. (1969). **Histologie normale et pathologique**. v. 1, Paris, Gauthier-Villars.

Ganter, P & Jollés, G. (1970). **Histologie normale et pathologique**. v. 2, Paris, Gauthier-Villars.

Gerlach, D. (1984). **Botanische Mikrotechnik: eine Einführung**. 3ed. Stuttgart, Georg Thieme.

Gregory, M & Baas, P. (1989). **A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons**. Israel Journal of Botany. v. 38, p.125-174.

Hagel, J. M; Yeung, E. C; Facchini, P. J. (2008). **Got milk? The secret life of laticifers**. Trends in plant Science. v. 13 (12), p. 631-639.

Inamdar, T. J. J. (1988). **Structure and development of extrafloral nectaries and trichomes in *Macaranga peltata* (Roxb.) Muell. Arg. (Euphorbiaceae)**. Acta Societatis Botanicorum Poloniae. v. 57 (2), p. 229 – 233.

Johansen, D.A. **Plant microtechnique**. (1940). McGraw-Hill, New York.

Lillie, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**. (1965). 3ed. McGraw-Hill, New York.

McManus, J. F. A. (1948). **Histological and histochemical uses of periodic acid**. Stain Technology. v. 23, p. 99-108.

Mahlberg, P. G; Davis, D. G; Galitz, D. S; Manners, G. D. (1987). **Laticifers and the classification of *Euphorbia*: the chemotaxonomy of *Euphorbia esula* L.** Botanical Journal of the Linnean Society. v. 94 (1), p. 165 – 180.

Nichol, P; Hall, J. L. (1988). **Characteristics of nectar secretion by the extrafloral nectaries of *Ricinus communis***. Journal of Experimental Botany. v. 39 (202), p. 573 – 568.

Pearse, A. (1985). **Histochemistry: theoretical and applied**. 4ed. v. 2, Edinburgh, C. Livingstone.

Pickard, W. F. (2008). **Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants**. The New phytologist. v. 177 (4), p. 877-888.

Pizzolato, T. D. (1977). **Staining of Tilia mucilages with Mayer's tannic acid- ferric chloride**. Bulletin of the Torrey Botanical Club. v. 104, p. 277-279.

Prenner, G.; Hopper, S, D., Rudall, P, J. (2008). **Pseudanthium development in *Calycopeplus paucifolius*, with particular reference to the evolution of the cyathium in Euphorbieae (Euphorbiaceae--Malpighiales)**. Australian Systematic Botany. v. 21, p. 153 – 161.

Prenner, G.; Rudall, P. J. (2007). **Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: Exploring the organ-flower-inflorescence boundary.** American Journal of Botany. v. 94 (10), p. 1612–1629.

Rudall, P. J. (1987). **Laticifers in Euphorbiaceae – a conspectus.** Botanical Journal of the Linnean Society. v. 94 (1), p. 143 – 163.

Rudall, P. J. (1994). **Laticifers in Crotonoideae (Euphorbiaceae): homology and evolution.** Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 81 (2), p. 270 - 282.

Sazima, M; Sazima, I; Carvalho-Okano, R. M. (1985). **Biologia floral de *Dalechampia stipulacea* (Euphorbiaceae) e sua polinização por *Euglossa melanotricha* (Apidae).** Revista Brasileira de Biologia. v. 45 (1), p. 85-93.

Souza, L.A.; Silva, A. C.; Moscheta, I.S. (2010). **Morphology and Anatomy of Flowers of *Dalechampia stipulacea* MÜLL. ARG. (Euphorbiaceae).** Acta Botanica Venezuela. v. 33 (1), p.103-117.

Thomas, V; Dave, Y. (1991). **Comparative and phylogenetic significance of the colleters in the family Apocynaceae.** Feddes Repertorium. v. 102 (1), p.177–182.

Webster, G. L. (1991). **A synopsis of the neotropical species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae).** Botanical Journal of the Linnean Society. v. 105 (1), p. 137 – 177.

Webster, G.L. (1994). **Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae.** Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 81, p. 33-144.

Considerações gerais

A evolução das flores e inflorescências em Euphorbiaceae tem como destaque os eventos da redução floral, tanto dos verticilos férteis, como dos estéreis, bem como a organização e rearranjo das flores de formas distintas sobre o eixo da inflorescência, culminando em diferentes formas, únicas dentre as Angiospermas, os pseudantos.

Estes apresentam morfologias muito diferentes, conforme as relatadas para as subfamílias às quais pertencem. Os fatores ontogenéticos que podem explicar esta diferença estão presentes logo no início da formação dos primórdios florais, tais como a formação de diversas categorias de brácteas, presença ou ausência de cálice, além das constrições verificadas nas flores de *Dalechampia* e *Euphorbia*, constrições estas ausentes nas flores de *Pera* e *Joannesia*, esta última pertencente a subfamília intermediária filogeneticamente.

Considerando a ocorrência dos pseudantos em Acalyphoideae e Euphorbioideae e também a variação floral presente em Crotonoideae, subfamília considerada filogeneticamente intermediária, conclui-se que as características estruturais e as reduções florais observadas nos pseudantos tiveram mais de uma origem ao longo da evolução de Euphorbiaceae e assim propomos que os pseudantos evoluíram não apenas de um processo de redução pela atividade diferencial dos meristemas, mas também de uma reorganização das flores ao longo do eixo da inflorescência. Os pseudantos de *Pera* apresentam etapas ontogenéticas similares aos demais pseudantos, no entanto características estruturais, tais como anteras deiscentes que se tornam foliáceas, presença de pistilódios e sementes exotégmicas, fazem de *Pera* um táxon ainda com posicionamento questionável, sendo necessárias análises aprofundadas que corroborem ou não sua elevação em nível de família, Peraceae.

Nos pseudantos e nas flores, as estruturas secretoras são diversas e classificadas como de proteção, tais como os laticíferos, coléteres e idioblastos, e também nupciais, como a glândula de resina e os nectários.

As espécies analisadas são pertencentes a subfamílias filogeneticamente distintas, estando as brácteas e as estruturas secretoras possivelmente relacionadas à variação morfológica e à história evolutiva do grupo, contribuindo nas diferentes síndromes de polinização.