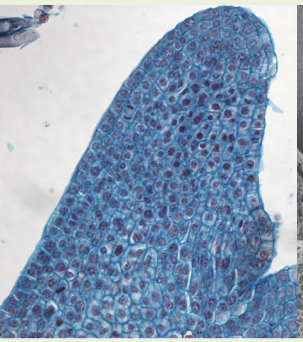
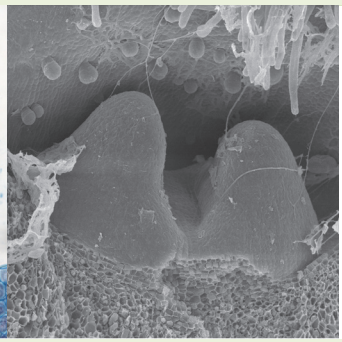
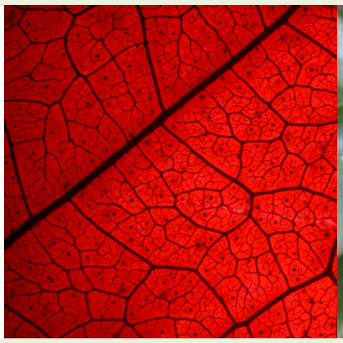
Rafael da Silva Cruz

Caracteres morfoanatômicos e ontogenéticos foliares de *Metrodorea* A.St.-Hil. e espécies relacionadas (Rutaceae) sob uma perspectiva filogenética







São Paulo
2013

Rafael da Silva Cruz

Caracteres morfoanatômicos e ontogenéticos foliares de *Metrodorea* A.St.-Hil. e espécies relacionadas (Rutaceae) sob uma perspectiva filogenética

Morphoanatomic and ontogenetic leaf characters of *Metrodorea* A.St.-Hil. and related species (Rutaceae) under a phylogenetic view

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

Área de Concentração: Anatomia de Plantas Vasculares

Orientadora: Profa. Dra. Gladys Flávia de Albuquerque Melo de Pinna

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica:

Cruz, Rafael S.

Caracteres morfoanatômicos e ontogenéticos foliares de *Metrodorea* A.St.-Hil. e espécies relacionadas (Rutaceae) sob uma perspectiva filogenética. São Paulo, 2013.
110 páginas.

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

1. Desenvolvimento; 2. Folhas simples e compostas; 3. Base e lâmina foliar; 4. Rutaceae; 5. Evolução. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

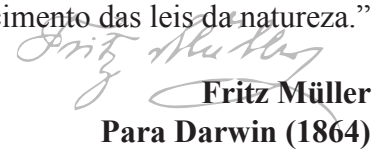
Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Gladys Flávia A. Melo de Pinna
Orientadora

À minha mãe Ana e minha avó Maria Madalena, que sempre acreditaram em mim.

"... isso somente me oferece a oportunidade de expressar o meu agradecimento público, que me obrigo a Darwin e que devo em tão grande extensão aos ensinamentos e estímulos provenientes do seu livro. Assim lanço tranquilamente este grão de areia na balança, contra a 'montanha de preconceito sob a qual este assunto está enterrado', despreocupado se os sacerdotes de uma ciência absoluta me juntem aos sonhadores ou às crianças no conhecimento das leis da natureza."



Fritz Müller
Para Darwin (1864)

Agradecimentos

À minha querida orientadora, **Gladys Flávia Melo-de-Pinna**, pela orientação, pelo incentivo à busca por respostas, por me ensinar que tantos novos avanços são conciliáveis com conhecimentos clássicos da botânica e por ser a grande responsável por me colocar no mundo científico. Também não posso deixar de agradecer tantos divertidíssimos momentos de descontração e tanto apoio em tantos incontáveis momentos, pelos quais serei sempre muito grato.

Ao grande Professor **José Rubens Pirani**, que sempre leu cuidadosamente meus textos, transmitindo sugestões riquíssimas com uma empolgação tão marcante que me motivava cada vez mais a me aprofundar na compreensão não só da família Rutaceae, mas de todas as suas queridíssimas angiospermas.

À **FAPESP** e à **CAPES**, pelas bolsas e auxílios financeiros concedidos ao projeto.

À **Juliana El Ottra**, que passo a passo vem se tornando uma das grandes estudiosas da morfologia floral em Rutaceae, não só pelas sugestões na escrita do projeto e na preparação da aula de qualificação, como pelas grandes discussões nas questões evolutivas da família.

Aos técnicos sem os quais esta dissertação seria impossível: **Irwandro Pires**, pelo auxílio com a preparação do material para microscopia eletrônica; **Viviane Jono**, pelo acesso ao herbário SPF e pontos de coleta; e claro, à tão prestativa **Tássia Santos** e à queridíssima **Gisele Costa**, do Laboratório de Anatomia Vegetal, por quebrarem tantos galhos, esclarecerem tantas dúvidas e perdoarem minhas bagunças.

Aos professores **Verônica Angyalossy**, **Gregório Ceccantini** e **Guillermo Angeles**, pela rica experiência em campo e em disciplinas. Ao Professor **Diego Demarco**, sempre muito atencioso às minhas dúvidas técnicas. E por fim à encantadora Professora **Nanuza Menezes**, cujas experiências tanto me motivaram a ingressar e a prosseguir na área. Também aos professores **Lúcia Lohmann** e **Renato Melo-Silva**, pela orientação no estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino realizado junto a eles. Os terei sempre como exemplo!

Aos meus colegas de equipe ao longo do mestrado **Aline Nunes**, **Ariane Lazarini**, **Carla Verna**, **Cristina Zampieri**, **Felipe Caldeira**, **Francisco Aires**, **Juliana Brasileiro**, **Karina Gonçalves**, **Ligia Keiko**, **Mario Albino, Mávyla Lima** e **Renata Lemos**. E claro, à **Julinha**

Pinna, importante integrante. Deixo um abraço especial à **Fernanda Cordeiro**, que tanto me ajudou nos momentos finais da dissertação e à **Marília Duarte**, que tanto se dedicou a resolver as questões de morfologia foliar em duas espécies de *Esenbeckia*, contribuindo com preciosos dados aqui presentes.

Aos demais colegas do laboratório por tantas conversas e cafés que acompanharam a concepção desta dissertação: **Alessandra Lupi**, **Bruna Alonso**, **Caian Gerolamo**, **Carolina Bastos**, **Giuliano Locosselli**, **Gustavo Burin**, **Julio Majcher**, **Karen Sasaki**, **Karina Bertechine**, **Luíza Teixeira**, **Marcelo Pace**, **Mariana Victorio**, **Nara Vogado**, **Nelly Araya**, **Paula Alecio**, **Raquel Koch**, **Rodrigo Angeles**, **Rodrigo Tsusuki**, **Suzy da Silva**, **Thália Gama**, **Vinícius Rubiano**, **Vítor Barão**, **Yasmim Hirao** e, em especial, à **Keyla Rodrigues** e à **Paula Elbl**. Aos queridos colegas do Laboratório de Algas Marinhas, principalmente à **Cintia Iha**, minha grande irmã que me acompanha desde o início da graduação.

Aos Gnatos, os membros da minha primeira república, pelo convívio agradável, mas com um carinho especial ao **Tiago Ribeiro**, à **Ana Figueiredo** e também ao **André Lima** e à **Bruna Ferreira**, estes dois últimos também maravilhosos colegas do laboratório.

Ao **Caio Caly**, ao **Dan Araújo** e ao **Frederico Cheregati**, os grandes amigos que conheci na universidade e que seguraram em minhas mãos durante meus surtos. E também ao **Elton Furlanetto**, que além de um grande amigo, colaborou muito para obter trabalhos de difícil acesso, entre eles a obra de Agnes Arber, base filosófica da morfologia abordada nesta dissertação.

Aos **Beatles** por *Hey Jude*.

Ao **Felype Fanti**, por cair na minha vida de paraquedas, simplificando tudo o que parecia tão complicado.

E à minha mãe **Ana Masaki** e minha avó paterna **Maria Madalena Leite** por tanto carinho, sempre de portas abertas e preocupadas com meu bem-estar. Eu nunca teria chegado longe sem este apoio. E ao meu irmão, **Davi Masaki**, com quem cacei dinossauros.

Muito obrigado!

Resumo

Metrodorea A. St.-Hil. é um gênero neotropical de Rutaceae, com espécies que apresentam folhas compostas ou unifolioladas e heterofilia, além de uma intrigante estrutura protetora de gemas em sua base. Filogenias moleculares disponíveis para a família apontam para uma necessidade de revisão de sua classificação tradicional, que deve encontrar respaldo em sinapomorfias morfológicas adequadas para os novos grupos estabelecidos.

Foi realizado um estudo da morfanatomia e ontogênese foliar de *Metrodorea* e grupos relacionados, observadas sob uma perspectiva filogenética, com dados disponíveis na literatura e obtidos de técnicas usuais em anatomia vegetal.

No primórdio de folha ocorre formação da base seguida de diferenciação acrópeta de primórdios de folíolos, sendo dois proximais pareados e um terminal nas folhas trifolioladas, mas apenas o terminal nas folhas simples e unifolioladas. Rudimentos de folíolos foram observados em espécies heterofilas de *Metrodorea*. Na base foliar das espécies deste gênero a estrutura protetora inicia-se como apêndices pareados, revelando uma condição estipular.

A quantidade de folíolos é dependente de uma maior ou menor determinação do primórdio foliar e sua redução pode ter sido favorecida pela perda de folíolos durante uma restrição do espaço necessário para o desenvolvimento.

Metrodorea tem como sinapomorfias a presença de aborto de folíolos, estípula intrapeciolar vascularizada, tricomas glandulares proximais adaxiais no pecíolo, folíolos evidentemente peciolulados, duas sementes por lóculo no fruto e estivação valvar da corola. Suas relações infragenéricas são debatidas de acordo com a localização dos cristais, forma de aderência da base das folhas e presença ou não de tricomas na lâmina foliar. A proximidade do gênero com *Raulinoa* é sustentada por uma maior quantidade de sinapomorfias morfológicas do que com outros gêneros. A monofilia de *Esenbeckia* não encontra apoio em nossos dados e *Helietta* + *Balfourodendron* (outrora de outra subfamília) são mais relacionados a *Esenbeckia*, *Raulinoa* e *Metrodorea* (antigas Pilocarpinae) do que com *Pilocarpus*, relação sustentada pela presença de tricomas glandulares no pecíolo, cristais prismáticos romboédricos, carpelos conatos e apófises dorsais do fruto.

Abstract

Metrodorea A. St.-Hil. is a Neotropical genus of Rutaceae, with species that have compound or 1-foliolated leaves and heterophylly, in addition to an intriguing bud-protecting structure on its basis. Available molecular phylogenies for the family indicate a need in reviewing its traditional classification, which must find support in appropriate morphological synapomorphies that support the new established groups.

We conducted a study of leaf ontogeny and morphoanatomy of *Metrodorea* and related groups, under a phylogenetic framework, with data available in the literature and obtained from standard techniques in plant anatomy.

In leaf primordia, the base formation is followed by acropetal differentiation of leaflet primordia, two paired proximal and one terminal on 3-foliated leaves, but only the terminal one on simple and 1-foliolated leaves. Leaflets rudiments were observed in heterophyllous species of *Metrodorea*. In species of this genus, at the base of the leaf, the protective structure emerges as paired appendages, revealing a stipular condition.

The number of leaflets is dependent upon a greater or lesser determination of leaf primordium and its reduction may have been favored by the loss of leaflets as consequence of a restriction of the space required for development.

Metrodorea synapomorphies found were: aborted leaflets, vascularized intrapeciolar stipules, glandular hairs in the proximal and adaxial region of the petiole, petiolulated leaflets, two seeds per locule in the fruit and valvar aestivation of the corolla. Their infrageneric relations are discussed according to the location of the crystals, adherence of the base of the leaves and the presence or absence of trichomes on the leaf blade. The close-relationship of the genus with *Raulinoa* is supported by a greater number of morphological synapomorphies than with other genera. The monophyly of *Esenbeckia* finds no support in our data and *Helietta* + *Balfourodendron* (formerly of another subfamily) are more related to *Esenbeckia*, *Raulinoa* and *Metrodorea* (former Pilocarpinae) than *Pilocarpus*, and such relationship is sustained by the presence of glandular hairs on the petiole, rhombohedral prismatic crystals, conate carpels and dorsal apophysis of the fruit.

Sumário

Introdução Geral 15

Capítulo I. Redução do número de folíolos a partir de um ancestral com folhas compostas: morfogênese foliar em *Metrodorea* A. St.-Hill, um gênero neotropical de Rutaceae com bases de folhas protetoras, e espécies relacionadas 29

Resumo 30

Introdução 31

Material e Métodos 33

Resultados 34

Discussão 38

Agradecimentos 45

Referências 46

Figuras 50

Capítulo II. Estudo morfológico e anatômico foliar comparativo de algumas Rutaceae neotropicais: *Metrodorea* A. St.-Hil. e espécies relacionadas 71

Resumo 72

Introdução 73

Material e Métodos 75

Resultados e Discussão 77

Agradecimentos 89

Referências 89

Figuras 92

Considerações Finais 107

Introdução Geral

Introdução Geral

Rutaceae Juss., família que inclui a arruda e os citros, compreende 154 gêneros e aproximadamente 2.100 espécies (Kubitzki et al. 2011). São árvores ou arbustos ou raramente ervas, por vezes espinescentes ou aculeados com glândulas contendo óleos voláteis aromáticos. Essas glândulas, nas folhas, se apresentam como cavidades secretoras multicelulares dispersas e podem ser identificadas como pontoações translúcidas (Engler 1931; Pirani 1999a; Judd et al. 2008; Kubitzki et al. 2011).

A equipe do Laboratório de Sistemática Vegetal (LSV) do Instituto de Biociências da USP tem realizado estudos taxonômicos e morfoanatômicos com grupos neotropicais da família Rutaceae, notadamente os pertencentes à tribo Galipeeae (Skorupa 1996; Pirani 1998; Pirani 1999a; Pirani 1999b; Groppo Jr 2004; Skorupa & Pirani 2004; Pirani 2004; Pirani et al. 2010; El Ottra et al. 2013). Também pesquisadores de outras instituições têm investigado do mesmo modo o grupo, e.g. o trabalho de Kaastra (1982), do Institute of Systematic Botany e os de Kallunki (Kallunki 1988; Kallunki 1992), do New York Botanical Garden; ou ainda em parceria com pesquisadores do LSV (Kallunki & Pirani 1998).

Os estudos filogenéticos feitos para Rutaceae neotropicais são muito escassos. As primeiras filogenias elaboradas para a família incluíram poucos representantes neotropicais (Chase et al. 1999; Poon et al. 2007). As realizadas por Groppo & Kallunki (2007), Groppo et al. (2008), Oliveira (2008), e Groppo (2010) têm incluído mais representantes neotropicais, sendo estas baseadas em dados moleculares e morfológicos. Também Muntoreanu (2008), no Laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Biociências da USP, utilizou a filogenia elaborada por Oliveira (2008) para mapear e averiguar a evolução de caracteres anatômicos foliares, com ênfase na subtribo Pilocarpinae (tribo Galipeeae).

Os resultados obtidos nos estudos filogenéticos supracitados vêm mostrando que antigas classificações, sobretudo as de trabalhos clássicos como a monografia de Engler (1931); com descrições detalhadas da morfoanatomia e a divisão taxonômica intrafamiliar que têm sido de grande valia, por ser o tratamento taxonômico mais abrangente para a família até então; não necessariamente estão de acordo com as filogenias que vêm sendo produzidas e por isso carecem de revisão

e aprimoramento. Por exemplo, trabalhos como Chase et al. (1999) e Groppo et al. (2008) apontam que nenhuma das subfamílias com mais de um gênero descritas por Engler (1931), mesmo com algumas pequenas modificações apresentadas por Scholz (1964), é monofilética, exceto Aurantioideae (onde está incluído o gênero *Citrus*).

Até o momento, existem poucos trabalhos publicados sobre a anatomia foliar de representantes de Rutaceae dentro de um contexto evolutivo. Ogundipe (2002) apresenta caracteres anatômicos úteis na delimitação infragenérica de *Zanthoxylum* L., tais como a organização do mesofilo, a distribuição dos estômatos e os padrões de venação. Em *Pilocarpus*, os estudos anatômicos mais recentes restringem-se ao de Marquete (1981), no qual foram estudadas as estruturas do pecíolo, lâmina e nervuras de *P. organensis* Occhioni & Rizzini (=*P. pauciflorus* A. St.-Hil.); e o de Gallardo & Jiménez (2002), no qual foi analisada a anatomia foliar de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (=*P. racemosus* Vahl), sendo as suas características xeromórficas descritas como adaptativas ao seu habitat e os de Muntoreanu (2008) e Muntoreanu et al. (2011), que explorou o estabelecimento de homologias de caracteres foliares em Rutaceae sob o paradigma filogenético. A anatomia foliar de *Raulinoa echinata* também foi explorada sob seus aspectos adaptativos (Arioli et al. 2008).

Outro gênero dentro da subtribo Pilocarpinae é o também neotropical *Metrodorea* A. St.-Hil., com as cinco espécies descritas ocorrentes no Brasil e poucos registros no Suriname e na Bolívia (Kaastra 1982; Pirani 1999a). São árvores ou arvoretas com caracteres florais idênticos aos do gênero *Esenbeckia* Kunth (Pirani 1999a); sendo que este último vem sendo apontado como grupo parafilético nas análises realizadas por Pirani (1999a) e Groppo (2010), uma vez que divide sua ancestralidade comum com outros gêneros, como *Metrodorea*. A característica mais marcante de *Metrodorea*, e única dentro de Rutaceae, é a presença de folhas opostas com bainhas, termo utilizado por Kaastra (1977), que em um mesmo nó formam uma estrutura cuculada que inicialmente recobre a gema apical jovem, abrindo-se com o desenvolvimento desta (Kaastra 1977; Pirani 1999a) (Fig. 1).

Kaastra (1977) discute em seu trabalho que a estrutura apontada como bainha em *Metrodorea*, baseado em conclusões tiradas a partir da vascularização da base da folha e anatomia nodal, já foi definida por diversos autores como outras estruturas, como lígula, estípula me-

Figura 1. *Metrodorea mollis*. Ramo com folhas trifolioladas opostas dotadas de estrutura cuculada na base.

diana ou, ainda, como homóloga aos espinhos de *Raulinoa* Cowan. No entanto o trabalho não apresenta dados anatômicos quanto ao desenvolvimento foliar, tratando apenas da descrição da morfologia das folhas jovens. Neste gênero encontramos ainda interessantes caracteres quanto à divisão da lâmina foliar, como heterofilia e folhas unifolioladas, bem como distintas morfologias relacionadas à base, que serão descritas nos capítulos subsequentes.

Trabalhos anatômicos sobre desenvolvimento foliar de angiospermas, como um todo, são escassos quando comparados ao de outros órgãos e percebemos facilmente esta escassez ao buscarmos o tema dentro da literatura de Rutaceae, no qual os poucos trabalhos que abordam o desenvolvimento têm como foco a histogênese de estruturas secretoras, entre eles o de Liu & Hu (1998), no qual foram estudadas a estrutura e a ontogênese das cavidades de 22 gêneros, 40 espécies e duas variedades de Rutaceae da China. Os autores, então, discutem seus dados à luz das possíveis relações entre as subfamílias e entre os gêneros de Rutaceae. Levando-se em conta a necessidade de se definir homologias primárias para a correta codificação de estados de caracteres em uma análise filogenética que forneça subsídios mais concretos para a construção de uma classificação (de Pinna 1991; Hawkins et al. 1997), estudos dentro da família são de fundamental importância para averiguar se há similaridade na composição e ontogenia das estruturas foliares, bem como se há correspondência topológica entre elas.

Os únicos trabalhos que se aproximam desta importante abordagem, dentro de Rutaceae, são os de Jeune & Lacroix (1993) e de Lacroix & Sattler (1994), que abordam aspectos da ontogênese foliar de *Murraya paniculata* (L.) Jack, espécie de folhas compostas pinadas. O primeiro trabalho aborda os aspectos quantitativos da expansão da lâmina foliar durante a organogênese, fornecendo um modelo matemático sob o qual ocorreria o mudança das dimensões métricas do órgão em desenvolvimento e o segundo aborda que alguns aspectos do desenvol-

vimento caulinar podem ser observados no desenvolvimento de uma folha composta pinada. No entanto, faltam trabalhos com ontogênese foliar em outras espécies da família, sobretudo espécies neotropicais.

Metrodorea é um bom modelo de estudo para ontogênese foliar pela presença de folhas compostas e folhas supostamente unifolioladas, o que é notável, dado que o padrão comum na família é a ocorrência de folhas compostas. Segundo Oliveira (2008), folhas unifolioladas em Rutaceae possuem uma articulação conspícua localizada entre o pecíolo e a lâmina foliar. O autor ainda afirma que a codificação de estado deste caráter (ora apresentado como folha simples, ora como folha composta bastante reduzida) tem se mostrado difícil dada a falta de dados anatômicos. Assim sendo, um estudo ontogenético foliar, feito em um contexto filogenético, não só facilitaria a codificação deste caráter, bem como permitiria a inferência de maneira acurada das mudanças num plano anatômico que poderiam levar a evolução de folhas simples a compostas e vice-versa, no grupo.

Em *Metrodorea* o pecíolo e respectiva expansão, aqui tratada como bainha, são as primeiras estruturas foliares formadas, como descrito por Kaastra (1977). Há dúvidas se um segundo e terceiro folíolos iniciam sua formação apenas nas folhas bifolioladas e trifolioladas ou se também chegam a ser formados em folhas unifolioladas, sendo abortados posteriormente, ao longo do desenvolvimento.

Esau (1974) destaca que variações nos padrões histogenéticos resultam em diferentes formatos das folhas. Assim como estruturas semelhantes podem ser produzidas por processos de crescimento diferentes, processos semelhantes podem conduzir à formação de estruturas diferentes, por meio de diferenças quantitativas do crescimento. Esta informação releva a necessidade de estudos de desenvolvimento foliar para estabelecer se há homologia primária (sensu de Pinna 1991) entre estruturas aparentemente semelhantes ou diferentes, comumente utilizadas em estudos sistemáticos.

O desenvolvimento foliar, embora estudado em teoria por muitos autores, é regido por grandes discussões dentro do meio acadêmico. Destacamos boas descrições em Foster (1936), Esau (1974) e Fahn (1974). No entanto, os trabalhos mais atuais com foco no controle genético do desenvolvimento foliar têm usado a divisão em três fases proposta por Dengler & Tsukaya

(2001) e descrita com mais detalhes morfoanatômicos por Beck (2010), descrição a qual apresentamos resumidamente nos parágrafos a seguir. Lembramos que se trata de um processo contínuo e tal divisão é meramente didática.

A primeira fase é a iniciação do primórdio, a partir do meristema apical caulinar, que começa com divisões periclinais da camada subsuperficial nos flancos do domo apical. Divisões adicionais tanto periclinais como anticlinais nas camadas subsuperficial e superficial dão origem, por fim, ao primórdio foliar.

A segunda fase é a morfogênese primária, com divisão e crescimento celular resultando num eixo primário, chamado de filopódio, dorsiventralmente simétrico e que virá a se tornar o pecíolo e a nervura central da folha. No fim desta fase, o filopódio aumenta em espessura e a lâmina da folha começa a se formar como enações de cada lado resultantes de citocinese nos meristemas marginais. A atividade contínua dos meristemas marginais resulta na expansão lateral da lâmina foliar. Em plantas com folhas compostas, os meristemas marginais tornam-se subdivididos e em cada subdivisão um folíolo irá se desenvolver, caracterizado pelo seu próprio filopódio com meristemas apicais e marginais. Em algumas plantas com folhas pecioladas, um meristema basal, próximo ao filopódio, se desenvolve, dando origem ao pecíolo. Em outros táxons o pecíolo é apenas resultado da supressão de meristemas marginais. No fim desta fase, tecidos provasculares (procâmbio) começam a se diferenciar no filopódio e lâmina em desenvolvimento, refletindo os padrões de venação.

Na terceira fase, de expansão e morfogênese secundária, a folha jovem continua seu desenvolvimento e diferenciação, chegando ao seu tamanho e forma madura. Durante esta fase, há aumento em área de superfície e volume e de acordo com Dale (1988) 95% das células são formadas. Em primórdios jovens e folhas muito jovens da maior parte das plantas vasculares, o meristema marginal tem duas ou mais camadas de espessura, sendo a externa comparável à protoderme do caule, de onde a epiderme se desenvolve. Os meristemas marginais, no entanto, têm vida curta e seqüencialmente a atividade meristemática é intercalar e difusa. O crescimento e diferenciação subseqüentes dão origem ao parênquima que se diferenciará como mesofilo e outras partes de tecido provascular, gerando padrões finais de venação.

Nos últimos 20 anos a publicação de trabalhos que tratam de morfogênese foliar tem

aumentado, com grandes avanços e descobertas dentro do contexto do controle molecular do desenvolvimento, devido ao aumento das pesquisas das "plantas modelo", como *Arabidopsis thaliana*, *Antirrhinum majus*, milho e também, devido à diversidade de mutantes quanto à morfologia foliar, o tomateiro e a ervilha (Dengler & Tsukaya 2001; Tsukaya 2010). No entanto, com a explosão de informações sobre a expressão gênica durante as fases de desenvolvimento foliar é de fundamental importância resgatar trabalhos anatômicos sobre ontogênese foliar. Tais trabalhos, outrora tão discutidos, têm sido deixados de lado atualmente, talvez por serem de difícil associação com os dados moleculares (Tsukaya 2010). Desta forma, do ponto de vista morfoanatômico, o desenvolvimento foliar das angiospermas continua menos compreendido em relação ao de outros órgãos.

Propõe-se então uma investigação anatômica da região foliar, principalmente nas regiões de crescimento (meristemas) durante a formação de folhas simples e compostas, bem como a descrição histológica da folha desenvolvida e região nodal nas espécies de gênero *Metrodorea*. Esta proposta vai, em parte, ao encontro do trabalho de Groppo et al. (2008) que afirma que estudos morfoanatômicos são necessários para entender a filogenia de Rutaceae.

Na análise cladística de alguns gêneros de Rutaceae feita por Pirani (1999a), o monofiletismo do gênero *Esenbeckia* fica questionado, uma vez que três das dez árvores igualmente parcimoniosas obtidas mostravam *Metrodorea* como parte de um clado com três espécies de *Esenbeckia* formando um grupo parafilético. Características tão marcantes apontam o monofiletismo do gênero *Metrodorea*, no entanto esta comprovação e as relações infragenéricas de *Metrodorea* só viriam a ser apontadas em um trabalho posterior. Dias et al. (submetido) proveram uma reconstrução filogenética de *Metrodorea* baseada em dados moleculares, apresentando suas relações infragenéricas e apontando uma relação mais íntima deste gênero com os gêneros *Balforodendron* Mello ex Oliver, *Helieta* Tul. e *Raulinoa* Cowan do que com *Esenbeckia pumila* Pohl, única espécie do gênero utilizada para a reconstrução.

Trabalhos recentemente realizados dentro do Laboratório de Anatomia Vegetal com Rutaceae (Muntoreanu 2008; Muntoreanu et al. 2011) geraram uma matriz de caracteres com dados anatômicos com ênfase no gênero *Pilocarpus*. Um trabalho semelhante com o gênero *Metrodorea* que levante estados de caracteres quanto à morfologia e anatomia foliar reuniria um

grande conjunto de dados úteis para a elaboração de uma matriz de caracteres morfológicos, a ser utilizada em uma discussão filogenética. Tal análise permitiria testar a homologia secundária dos caracteres (sensu de Pinna 1991), ou alternativamente se há a existência de homoplasias, e onde elas surgem em árvores filogenéticas como a de Dias et al. (submetido), provendo possíveis dados esclarecedores para a compreensão das relações no grupo.

Em *Metrodorea*, por fim, destacamos as seguintes questões a serem estudadas:

- Qual a origem da estrutura apontada por Kaastra (1977) como bainha?
- Qual o estado de caráter ancestral no gênero quanto à divisão da lâmina foliar? E conseqüentemente, a partir deste, qual foi a ordem de evolução quanto a redução ou aumento do número de folíolos?
- As folhas unifolioladas são legítimas folhas compostas cuja articulação representa a posição de folíolos muito reduzidos e/ou perdidos ou apenas folhas simples típicas com desenvolvimento semelhante a outras angiospermas de folhas simples?
- Os dados morfoanatômicos proveem boas sinapomorfias que sustentem as relações das filogenias moleculares existentes?

A resolução destas questões, conforme apresentado neste trabalho, pode vir a trazer subsídios ou até mesmo fornecer um bom modelo para elucidar os processos ontogenéticos que constroem os diferentes padrões encontrados em folhas de Rutaceae. Além de um conjunto de informações descritivas detalhadas quanto à anatomia e desenvolvimento foliar, pouco estudados na família, um trabalho abrangendo estes tópicos, como este, pode vir a ser um acréscimo de dados relevantes para a taxonomia e filogenia do grupo.

Desta forma, este trabalho, após esta introdução, apresentar-se-á em dois capítulos, na forma de artigos submetidos para publicação, mais considerações finais. O primeiro capítulo versará sobre a ontogênese foliar de *Metrodorea* e espécies relacionadas, discutindo a adequação da terminologia botânica para as estruturas de difícil interpretação disponível dentro das vertentes filosóficas da Ciência da Forma em Botânica. O segundo capítulo apresentará uma descrição anatômica foliar, que junto a outros dados morfológicos disponíveis na literatura, proverão uma rica discussão ao serem confrontados com as filogenias disponíveis. Por fim, as considerações finais elencarão as principais contribuições deste trabalho e a gama de trabalhos

que, apesar de avanços, ainda são necessários.

Referências

Arioli T, Voltolini CH, Santos M (2008) Morfoanatomia foliar da reófita *Raulinoa echinata* R.S. Cowan – Rutaceae. Acta botanica brasilica 22:723–732

Beck CB (2010) An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge

Chase MW, Morton CM, Kallunki JA (1999) Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from RBC and ATP sequence variation. American Journal of Botany 86:1191–1199

Dale JE (1988) The control of leaf expansion. Annual review of plant physiology and plant molecular biology 39:267–295

de Pinna MCC (1991) Concepts and tests of homology in the cladistic paradigm. Cladistics 7:367–394

Dengler NG, Tsukaya H (2001) Leaf morphogenesis in dicotyledons: current issues. International Journal of Plant Sciences 162:459–464

Dias P, Udulutsch RG, Kallunki JA, Pirani JR (submetido) Molecular phylogeny and biogeography of *Metrodorea* (Rutaceae): biogeographic implications for South America

Engler A (1931) Rutaceae. Engler, A; Prantl, K. (eds.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Velag Von Wiilhelm Engelmann, Leipizig, pp 187–359

Esau K (1974) Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher, São Paulo

Fahn A (1974) Plant Anatomy, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford

Foster AS (1936) Leaf differentiation in angiosperms. The Botanical Review 2:349–372

Gallardo LH, Jiménez ME (2002) Anatomía foliar de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). Caldasia 24:269–275

Groppo Jr M (2004) Filogenia de Rutaceae e revisão taxonômica de *Hortia* Vand. (Rutaceae). Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado

Groppo M (2010) Estudos filogenéticos em rutáceas neotropicais: presente e futuros. Simpósio

de Sapindales. X Congresso Latinoamericano de Botánica

Groppo M, Kallunki JA (2007) Phylogenetic analyses of the subtribe Galipeinae (Rutaceae). Colloquium of Evolution and Diversification in the Sapindales. Botany & Plant Biology Congress

Groppo M, Pirani JR, Salatino MLF, et al. (2008) Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. American Journal of Botany 95:985–1005

Hawkins JA, Hughes CE, Scotland RW (1997) Primary homology assessment, characters and character states. Cladistics 13:275–283

Jeune B, Lacroix CR (1993) A quantitative model of leaflet initiation illustrated by Murraya paniculata (Rutaceae). Canadian Journal of Botany 71:457–465

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, et al. (2008) Plant systematics: a phylogenetic approach, 3rd ed. Sinauer Associates

Kaastra RC (1982) Pilocarpinae (Rutaceae). Flora Neotropica 33:1–197

Kaastra RC (1977) Leaf sheaths and obturators in Rutaceae - Pilocarpinae. Beitrage zur biologie der pflanzen 53:317–320

Kallunki JA (1988) A new species of *Galipea* (Rutaceae) from Nicaragua and Costa Rica. Brittonia 40:241–244

Kallunki JA (1992) A revision of *Erythrochiton* sensu lato (Cuspariinae, Rutaceae). Brittonia 44:107–139

Kallunki JA, Pirani JR (1998) Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* JC Mikan (Rutaceae). Kew Bulletin 257–334

Kubitzki K, Kallunki JA, Duretto M, Wilson PW (2011) Rutaceae. In: Kubitzki K (ed) The families and genera of vascular plant Vol. 10: Flowering Plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer, Berlin, pp 276–356

Lacroix CR, Sattler R (1994) Expression of shoot features in early leaf development of *Murraya paniculata* (Rutaceae). Canadian Journal of Botany 72:678–687

Liu WZ, Hu ZH (1998) Comparative anatomy of secretory cavities in leaves of the Rutaceae in China. Acta Phytotaxonomica Sinica 36:119–127

Marquete O (1981) Anatomia e vascularização foliar e floral de *Pilocarpus organensis* Occhioni

& Rizzini (Rutaceae). Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 25:117–159

Muntoreanu TG (2008) Descrição e mapeamento de caracteres morfoanatômicos foliares em *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) e gêneros relacionados. Universidade de São Paulo, São Paulo. Dissertação de Mestrado

Muntoreanu TG, Cruz R da S, Melo-de-Pinna GF (2011) Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. Plant Systematics and Evolution 296:87–99

Ogundipe OT (2002) Leaf anatomical studies on eleven species of *Zanthoxylum* Linn. (Rutaceae). Phytomorphology 52:103–112

Oliveira PD (2008) Filogenética de Pilocarpinae (Rutaceae). Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado

El Ottra JHL, Pirani JR, Endress PK (2013) Fusion within and between whorls of floral organs in Galipeinae (Rutaceae): structural features and evolutionary implications. Annals of Botany 111:821–37

Pirani JR (1998) A revision of *Helietta* and *Balfourodendron* (Rutaceae-Pteleinae). Brittonia 50:348–380

Pirani JR (1999a) Estudos taxonômicos em Rutaceae: revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), análise cladística de Pteleinae, sinopse de Rutaceae no Brasil. Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Livre Docência

Pirani JR (1999b) Two new species of *Esenbeckia* (Rutaceae, Pilocarpinae) from Brazil and Bolivia. Botanical Journal of the Linnean Society 129:305–313

Pirani JR (2004) Three new species of *Galipea* (Rutaceae, Galipeinae) from Brazil. Botanical Journal of the Linnean Society 144:365–373

Pirani JR, El Ottra JHL, Menezes NL (2010) Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea* Aubl. e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais. Revista Brasileira de Botânica 33:301–318

Poon W, Shaw P, Simmons M, But P (2007) Congruence of molecular, morphological, and biochemical profiles in Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddalioideae. Systematic Botany 32:837–846

Scholz H (1964) Rutales. H. Melchior in A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien. pp 262–277

Skorupa LA (1996) Revisão taxonômica de Pilocarpus Vahl (Rutaceae). Universidade de São Paulo, São Paulo. Tese de Doutorado

Skorupa LA, Pirani JR (2004) A new species of Pilocarpus (Rutaceae) from northern Brazil. Brittonia 56:147–150

Tsukaya H (2010) Leaf development and evolution. Journal of Plant Research 123:3–6

— If a compond leaf could speak, it might say: 'I am a shoot as well as a leaf'
Rutishauser & Isler (2001)

Capítulo I

Redução do número de folíolos a partir de um ancestral com folhas compostas: morfogênese foliar em *Metrodorea* A. St.-Hill, um gênero neotropical de Rutaceae com bases de folhas protetoras, e espécies relacionadas

Rafael Cruz, Marilia Duarte, José Rubens Pirani & Gladys Flávia A. Melo-de-Pinna

Versão em Língua Portuguesa de artigo a ser submetido para o periódico *American Journal of Botany*

Resumo

Premissa do estudo: Apesar de possivelmente possuir um ancestral de folhas compostas pinadas, Rutaceae possui espécies com grande diversidade morfológica de folhas, inclusive simples e unifolioladas. *Metrodorea* A. St.-Hil. é um gênero neotropical, com espécies que apresentam folhas compostas, unifolioladas e heterofilia, além de uma intrigante estrutura protetora de gemas em sua base. Este trabalho propõe um estudo ontogenético para explorar a morfogênese foliar do grupo.

Métodos: Uma análise comparativa de secções histológicas e microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o ápice caulinar de cinco espécies do gênero *Metrodorea*, quatro espécies de *Esenbeckia*, *Helietta apiculata* e *Raulinoa echinata*.

Principais resultados: No primórdio de folha ocorre formação da base seguida de diferenciação acrópeta de primórdios de folíolos, sendo dois proximais pareados e um terminal nas folhas trifolioladas, mas apenas terminal nas folhas simples e unifolioladas. Rudimentos de folíolos foram observados em espécies heterofilas de *Metrodorea*. Na base foliar das espécies deste gênero, a estrutura protetora inicia-se como apêndices pareados, revelando uma condição estipular.

Conclusões: A quantidade de folíolos é dependente de uma maior ou menor determinação do primórdio foliar e sua redução pode ter sido favorecida pela perda de folíolos durante uma restrição do espaço necessário para o desenvolvimento. Estípulas representam uma autapomorfia do gênero *Metrodorea*.

Palavras chave: Desenvolvimento foliar; base de folha; folhas simples e compostas; estípulas; *Fuzzy Arberian Morphology*

Introdução

A versatilidade do desenvolvimento foliar em diferentes grupos de plantas com flores é responsável pela riqueza de formas encontradas neste órgão. Dentre os caracteres morfológicos mais utilizados em descrições para diversos fins, destacam-se o tipo de divisão da folha (simples e compostas) e tipos de modificações da base como pecíolos alados, bainhas, estípulas, etc. (Radford et al., 1974; Bell and Bryan, 2008).

Folhas compostas surgiram mais de uma vez ao longo da evolução das plantas vasculares e mesmo das angiospermas e alguns de seus mecanismos de ontogênese parecem divergir, levantando debates sobre as homologias entre seus grupos (Bharathan et al., 2002; Friedman et al., 2004; Efroni et al., 2010). Possíveis vantagens relacionadas à existência de folhas compostas foram recentemente revistas e questionadas por Warman et al. (2011), como a otimização no uso de recursos hídricos e redução de danos por herbívoros. De qualquer forma, a evolução convergente desta morfologia em tantos grupos aponta para uma possível adaptação relacionada a ela. Efroni et al. (2010) ressaltam ainda que, nos diversos grupos, os diferentes mecanismos moleculares de ontogênese de folha composta podem possuir maior ou menor grau de integração e homologia, sendo que mecanismos universais não podem ainda ser apontados com a quantidade de dados disponíveis, sugerindo mais estudos para identificar homologias a um nível mais profundo. Além disso, o retorno à condição de folhas simples, evidenciado em vários grupos com predomínio de folhas compostas, permanece ainda pouco explorado em termos ontogenéticos e filogenéticos.

Há duas hipóteses vigentes para o surgimento de folhas compostas: *(i)* folíolos seriam homólogos a porções de uma única folha simples que teria sofrido profunda lobação e tornando-se dividida (Eames, 1961; Kaplan, 2001), e *(ii)* a folha composta seria homóloga a um sistema caulinar reduzido, que apresentaria estruturas planares (folíolos) homólogas às folhas em um eixo mais ou menos indeterminado homólogo a um caule (Arber, 1950; Lacroix and Sattler, 1994; Rutishauser and Isler, 2001). Ambas as hipóteses ganharam reforços em trabalhos recentes (Hareven et al., 1996; Sinha, 1997; DeMason and Villani, 2001; Champagne and Sinha, 2004; Champagne et al., 2007) e não são necessariamente excludentes. O desenvolvimento

de estruturas planares laterais (tanto folhas simples como folíolos) envolve o estabelecimento de polaridades (próximo-distal, médio-lateral e adaxial-abaxial), uma maior determinação do crescimento e surgimento de zonas de crescimento laterais que formarão as margens da lâmina foliar, tanto em primórdios que surgem no meristema apical caulinar (folhas), como em enações dos primórdios de folha (primórdios de folíolos) (Efroni et al., 2010).

Rutaceae Juss. pertence a Sapindales, ordem com forte sustentação de dados macromoleculares e que tem como possível sinapomorfia a presença de folhas pinadas (Gadek et al., 1996; Stevens, 2001 onwards). No entanto, Rutaceae apresenta uma rica diversidade de folhas quanto à divisão de lâmina foliar. Além de folhas compostas pinadas, palmadas, bi ou trifolioladas e folhas simples, há a presença de folhas unifolioladas que têm sido interpretadas ou como folhas simples dotadas de uma articulação entre o pecíolo e a lâmina (Bell and Bryan, 2008), ou como folhas compostas que sofreram redução no número de folíolos, mantendo uma articulação ou intumescimento como evidência desta perda (Kubitzki et al., 2011). Neste último trabalho, embora os autores descrevam esta diferença entre folhas unifolioladas e simples (apontando ambas como presentes em Rutaceae), propõem-se a tratar todos os gêneros com folhas simples ou unifolioladas como tendo folhas unifolioladas.

Metrodorea A. St.-Hil. é um bom representante desta diversidade foliar em Rutaceae. Este gênero neotropical sul-americano com monofilia indicada por uma característica pouco usual, tida como sinapomorfia: a base da folha apresenta uma estrutura cuculada (em forma de capuz), descrita pela literatura como bainha (Kaastra, 1977, 1982), apesar de sua morfologia distinta quando comparada às bainhas de outras angiospermas. A filotaxia oposta em *Metrodorea*, um caráter também pouco comum na família, leva ao pareamento das estruturas cuculadas, encerrando o ápice caulinar e protegendo-o, abrindo-se com o desenvolvimento do caule e permitindo a expansão das folhas jovens (Fig. 1). Cinco espécies compõem os tratamentos taxonômicos mais recentes (Kaastra, 1982; Kubitzki et al., 2011), sendo que uma espécie possui somente folhas unifolioladas (*M. maracasana*, Fig. 2), enquanto as demais espécies apresentam heterofilia (folhas com um a três folíolos), sendo uma delas (*M. stipularis*) não dotada de porção do pecíolo livre da estrutura protetora, com os folíolos conectados diretamente à estrutura cuculada (Tabela I). Uma sexta espécie (*M. concinna*) foi recentemente descrita com apoio de

uma filogenia molecular (Dias et al., 2013).

A redução da condição folha composta para simples ou unifoliolada em Rutaceae carece de estudos e a verdadeira natureza da estrutura protetora de *Metrodorea* permanece enigmática. Desta forma, apresentamos um estudo da morfogênese foliar deste gênero e de espécies proximamente relacionadas de acordo com as filogenias de Groppo et al. (2008) e Dias et al. (submetido apud Dias et al., 2013), trazendo informações inéditas para a compreensão da evolução da morfologia foliar no grupo.

Material e Métodos

As espécies utilizadas para o estudo encontram-se listadas na Tabela 1. Ramos de cada uma delas foram fixados em FAA 50 - formaldeído, ácido acético e etanol 50% - (Johansen, 1940) e estocados em etanol 70%. De cada ramo foram retiradas regiões correspondentes ao ápice caulinar.

O material foi submetido à técnica de inclusão em parafina, seguindo metodologia descrita por Johansen (1940) com uso da série etanol/álcool butílico terciário (50-100%). As lâminas foram coradas com safranina 1% em etanol 50% e azul de astra 1% em etanol 50% (Bukatsch, 1972) e, posteriormente, montadas utilizando resina sintética. Foram feitos cortes transversais e longitudinais em série. Ápices foram dissecados com o auxílio de estiletes para a retirada das folhas maiores e submetidos à técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo, para isto, desidratados em série etanólica e submetidos a ponto crítico. Posteriormente, foram aderidos a suportes metálicos e cobertos com ouro, conforme o procedimento usual de MEV, descrito por Silveira (1989). As análises anatômicas das secções foram realizadas em microscópio óptico com as principais estruturas registradas no Sistema de Digitalização de Imagens acoplado ao microscópio Leica DMBL.

Tabela 1. Espécies utilizadas e suas principais características foliares.

Espécie	Folhas		Filotaxia
	Segundo Kaastra (1982)	Segundo Pirani (1999a)	
Metrodorea flavida Krause	Folhas 1-3-folioladas geralmente com folíolos sésseis ou peciolulados.	Folhas compostas 1-3-folioladas.	Oposta
Metrodorea mollis Taubert.	Folhas (2-)3-folioladas com folíolos sésseis.		
Metrodorea nigra A. St.-Hil.	Folhas 1-3-folioladas com folíolos subsésseis.		
Metrodorea maracasana Kaastra	Folhas 1-folioladas com folíolos ± sésseis.	Folhas uniformemente unifolioladas.	
Metrodorea stipularis Mart.	Folhas (2-)3-folioladas com folíolos curto-peciolulados.	Folhas trifolioladas, com pecíolo e bainha inteiramente adnatos, os três peciólulos inseridos diretamente na bainha.	
Raulinoa echinata Cowan	Folhas simples pecioladas.	Folhas simples pecioladas.	
Helietta apiculata Benth.	-	Folhas 3-folioladas, sésseis.	
Esebeckia grandiflora Mart.	Folhas 1-folioladas, com folíolos sésseis.	Folhas 1-folioladas	Alterna
Esenbeckia irwiniana Kaastra	Folhas 3-folioladas com folíolos peciolulados.	Folhas 3-folioladas com folíolos peciolulados.	
Esenbeckia leiocarpa Engl.	Folhas simples.	Folhas simples.	
Esenbeckia pilocarpoides Kunth subsp. *pilocarpoides*	Folhas 1-folioladas, com folíolos sésseis.	Folhas 1-folioladas.	

Resultados

Em *Metrodorea* o primórdio foliar mais jovem observado no ápice caulinar é caracterizado pela presença de duas camadas de células superficiais (L_1 e L_2) que apresentam apenas divisões anticlinais. As camadas subjacentes apresentam divisões em outros planos, resultando em acréscimo de volume ao primórdio. Cordões de procâmbio formam-se na região do primórdio, entre a base da folha e o caule, determinando, assim, a posição do sistema vascular (Fig. 3). Esse padrão inicial foi observado também nas demais espécies analisadas.

Em *Esenbeckia irwiniana* e *Helietta apiculata*, espécies de folhas trifolioladas, três enações distais no primórdio foliar são evidentes como primórdios de folíolos, sendo a central maior que as laterais (Fig. 4). Nas espécies de folhas simples e unifolioladas, como *E. leiocarpa*, *E. grandiflora*, *E. pilocarpoides* e *Raulinoa echinata*, o primórdio apresenta-se com a

sua base maior em diâmetro e sua porção distal menor (Fig. 5). Em *E. pilocarpoides*, foram observadas projeções laterais na base do primórdio da folha (Fig. 5). A filotaxia destas espécies já é evidente precocemente na formação dos primórdios, sendo oposta em *H.* apiculata e *R. echinata* e alterna nas espécies de *Esenbeckia* aqui estudadas (mas existem espécies de filotaxia decussada neste gênero).

Em espécies de *Metrodorea*, com primórdios de folhas também evidentemente opostos (Figs. 6-7, 9-10), enações muito semelhantes às das espécies trifolioladas dos outros gêneros foram observadas em estágios iniciais (Figs. 6, 9). No entanto, a região adaxial do primórdio foliar entre as duas enações laterais apresenta uma expansão, anatomicamente identificada como oriunda de divisões periclinais da camada L_2 (Figs. 7-8). Conforme aumenta em superfície e volume, esta extensão torna-se indistinta das enações laterais e seus bordos tocam os bordos da projeção adaxial da folha oposta, encerrando o ápice meristemático (Figs. 9-10). Secções transversais revelam que as divisões adaxiais formam fileiras radiadas de células (Fig. 11). Observa-se também uma expansão na região abaxial do primórdio, mas neste caso a camada L_2 apresenta apenas divisões periclinais (Fig. 8).

Em *Metrodorea*, embora haja expansão radial dos primórdios foliares na região que formará a lâmina (ápice do primórdio) e a base da folha, a região de interface entre base e lâmina não acompanha este crescimento, resultando em uma constrição (Figs. 12-15). No caso de folhas trifolioladas, há três constrições, relacionadas a cada folíolo (Fig. 13). Nas espécies com porção do pecíolo livre da estrutura cuculada, uma nova expansão surge, após o recobrimento do ápice caulinar (Fig. 12). Neste caso, ocorre entre a primeira expansão e a constrição, oriunda de divisões celulares em diferentes planos. Posteriormente há um crescimento no sentido do eixo na região distal da base da folha, gerando o pecíolo (Figs. 15-16). Em *M. stipularis*, única espécie não dotada de porção de pecíolo livre da estrutura cuculada, não é observada essa segunda expansão adaxial, nem as demais etapas para a formação de pecíolo, apenas a constrição (Fig. 17).

A estrutura cuculada de *Metrodorea* apresenta algumas variações. Os bordos unidos da estrutura podem ser amplos e dotados de células papilosas ou tricomas tectores curtos dotados de densa cutícula, que se entremeiam como um zíper, como observado em *M. flavida* e *M.*

mollis (figuras 18, 20-21) ou amplos e glabros como em *M. stipularis* e *M. maracasana* (Figs. 19, 24). Em *M. nigra*, a margem da estrutura não é ampla. Em todas as espécies, a face adaxial (porção interna) da estrutura cuculada, apresenta tricomas glandulares proximais e longos tricomas tectores distais que se entrelaçam unindo as bases foliares das folhas opostas nas estruturas de margem glabra ou reforçando esta adesão nas que são dotadas de células papilosas e tricomas curtos (Figs. 23-24). Todas as espécies, exceto *M. nigra*, apresentam ainda feixes vasculares colaterais associados à projeção adaxial da estrutura cuculada, oriundas de porções que se destacam dos traços laterais antes destes se unirem com o traço central em um cilindro único no pecíolo (Figs. 18, 20, 22).

Nas espécies de *Esenbeckia,* durante a formação inicial da base da folha, são presentes divisões adaxiais semelhantes as que formam a estrutura cuculada de *Metrodorea*. A região onde ocorrem divisões adaxiais que envolvem a camada L_2 parece delimitar a base foliar em relação à lâmina em *Esenbeckia* (Fig. 25-26). No entanto, neste caso, não há presença de uma constrição evidente como a de *Metrodorea* e a de *Helietta*, no início do desenvolvimento. O pecíolo se desenvolve ao longo do eixo próximo-distal da base, a partir de divisões celulares de orientação difusa. Em *E. irwiniana*, os primórdios de folíolos são identificados por enações que apresentam na camada L_2 apenas divisões anticlinais, ao contrário do que acontece durante a formação da região adaxial de bases de folha (Fig. 27). Em *E. grandiflora* e *E. pilocarpoides*, a lâmina foliar apresenta-se articulada com o ápice do pecíolo, por meio de um intumescimento. Em *E. leiocarpa*, o intumescimento é evidente na região da nervura central na base da lâmina foliar (Fig. 28), sendo que as margens desta se atenuam até abaixo da constrição. Embora o intumescimento possa estar relacionada com a interface lâmina-base, sua estrutura é diferente das constrições observadas em *Metrodorea*, com proliferação de tecido cortical e, em *E. grandiflora*, instalação de uma periderme (Fig. 29). As enações laterais de *E. pilocarpoides* do início da morfogênese (Fig. 4) são mantidas e apenas o ápice do primórdio se expande para a formação da lâmina foliar (Fig. 30).

Os primórdios foliares de *Helietta apiculata* formam constrições entre a base da folha (Figs. 31-32) e lâminas dos três folíolos, semelhantes às de *Metrodorea*, o que não foi observado em *Raulinoa echinata*, cujos internós no ápice caulinar são muito curtos e cujos primórdios

foliares, sempre decussados, apresentam-se em roseta (Fig. 33). As bases das folhas opostas são as primeiras estruturas formadas, com longos tricomas concentrados na face adaxial, permitindo a união da porção proximal da base da folha por entrelaçamento (Figs. 34-36). Esses tricomas concentrados na região adaxial, realizando adesão de bases foliares, não são encontrados em *H. apiculata* e em *Esenbeckia*, mas são muito semelhantes aos tricomas tectores longos encontrados na região adaxial da estrutura protetora de *Metrodorea*.

Em três das quatro espécies de *Metrodorea* que apresentam heterofilia, rudimentos de folíolos foram observados de diferentes formas. Ao longo de uma das séries seccionadas do ápice de *Metrodorea nigra* (Figs. 37-42), com duas gemas (uma apical caulinar e uma axilar) observa-se que os primórdios do ápice caulinar se dividem em três folíolos cada e os primórdios oriundos da gema axilar se dividem em dois folíolos cada, totalizando dez primórdios foliolares protegidos pela estrutura cuculada e entremeados entre si, dobrados de forma conduplicada (terminologia de Bell and Bryan, 2008), no que se refere a cada folíolo, e obvoluta (Bell and Bryan, 2008) no que se refere à organização dos folíolos entre si. Junto às folhas bifolioladas, em estágios avançados de morfogênese primária, foram observadas pequenas estruturas de anatomia semelhante a primórdios de folíolos em início de morfogênese primária, correspondendo a um terceiro folíolo com desenvolvimento muito incipiente em relação aos demais (Fig. 40). Em *Metrodorea mollis*, em um dos ápices observados, o par de folhas expandidas que o envolvia apresentava em cada uma delas um folíolo lateral rudimentar ao lado de dois folíolos totalmente expandidos (Fig. 43). Anatomicamente, o folíolo rudimentar observado apresenta-se como uma estrutura evidentemente laminar, com diferenciação de um cilindro vascular da nervura central (Fig. 44). A região marginal do folíolo desenvolvido apresenta um distinto parênquima paliçádico e feixes colaterais (três em um lado e dois em outro, na região mais larga do folíolo). Folíolos rudimentares como esses foram encontrados em alguns ramos do material coletado em folhas jovens, mas nunca em folhas velhas, indicando uma abscisão precoce dessas estruturas. Um ápice dissecado de *Metrodorea flavida* revelou um par de folhas sendo uma trifoliolada, com folíolos similares, e uma bifoliolada, com um folíolo de tamanho semelhante aos da folha oposta, entremeado com o folíolo mediano dela. O terceiro folíolo, muito menor, tem sua expansão limitada pelos demais primórdios contra a estrutura cuculada (Fig. 45).

A estrutura anatômica da lâmina foliar da folha adulta (Fig. 46) tem origem de regiões de crescimento marginais observadas claramente em *Metrodorea nigra*, na qual a célula submarginal dá origem à camada subprotodérmica (sendo que a adaxial dará origem ao parênquima paliçádico) e a uma camada intermediária, responsável pela formação de parênquima lacunoso (junto à região abaxial da camada subprotodérmica) e a tecido provascular (Figs. 47-48). A diferenciação destas regiões marginais ocorre de forma basípeta ao longo do primórdio de folíolo.

Discussão

O trabalho realizado é o primeiro a abordar desenvolvimento foliar em espécies neotropicais de Rutaceae. Nos primórdios de folíolo observados, em estágios iniciais da morfogênese, observa-se claramente a presença de uma camada mais externa (L_1) e uma camada subjacente a ela (L_2) com divisões predominantemente anticlinais revelando não apenas uma semelhança com o ápice caulinar, mas uma continuidade de tecidos meristemáticos tanto do caule como da folha no ápice do sistema caulinar, como observado no trabalho de Lacroix & Sattler (1994), que descreve a ontogênese foliar da Rutaceae asiática *Murraya paniculata* (L.) Jacq.

Lacroix & Sattler (1994) apontam que características do desenvolvimento caulinar são presentes, como a organização túnica-corpo do ápice da folha em desenvolvimento e surgimento acrópeto de primórdios que dão origem a um sistema de estruturas laterais (folíolos) que posteriormente tornam-se planares e obedecem a uma filotaxia. Diante disto, os autores sugerem que uma folha pinada tem origem da expressão de características caulinares (um sistema de produção de órgãos laterais) em primórdios de folhas. Uma região meristemática apical também foi relatada em folhas compostas de *Murraya koenigii* (L.) Spreng. (Rutaceae) e *Rhus typhina* L. (Anacardiaceae, também da ordem Sapindales), sendo sugerido por Rutishauser & Isler (2001) que esta região deveria se chamar meristema apical foliar.

Guarea, *Chisocheton* e *Megaphyllaea* são gêneros de Meliaceae, outra família de Sapindales, tidas como desajustes de *bauplans* baseados em morfologia clássica (Bell and Bryan, 2008). Segundo Steingraeber & Fisher (1986), suas folhas pinadas de crescimento indeterminado, com uma gema terminal de atividade intermitente, podem produzir estruturas planares por

anos, sujeitas à abscisão e crescimento secundário do eixo. Tal fato foi primeiramente reportado em *Guarea rhopalocarpa* Radlk., na Costa Rica, por Skutch (1946), que descreveu a presença de anéis de crescimento no pecíolo e raque, além de deposição de periderme. Essas características permitiriam tratar as folhas desses gêneros como eixos caulinares, mas a morfologia clássica prontamente as classifica como folhas, uma vez que cada folíolo não porta em sua axila uma gema capaz de dar origem a um ramo vegetativo ou reprodutivo. Além disso, considera-se também o fato de os demais gêneros da família desenvolverem folhas compostas pinadas típicas.

A alternativa mais promissora é a abordagem contínua, na qual folha e caule não são órgãos mutualmente excludentes, mas contínuos e tão intimamente relacionados que uma distinção clara entre eles é irreal (Lacroix and Sattler, 1994; Kirchoff, 2001; Rutishauser and Isler, 2001). Rutichauser & Isler (2001) adotam o termo *Fuzzy Arberian Morphology* para esta perspectiva, em homenagem à anatomista Agnes Arber, grande expositora da *partial-shoot theory*. Segundo Arber (1950), no lugar de discriminar o caule da folha, devemos transcender o modelo clássico e assumir que a folha possui características axiais, como um cilindro vascular presente na região nervura central e em pecíolos, bem como em gavinhas e espinhos tidos como modificações foliares. Além dessas características, encontramos características laminares nas margens da lâmina foliar (regiões laterais à região da nervura central), estípulas, alas laterais e bases invaginantes. As folhas compostas, segundo aquela autora, nada mais são que sistemas caulinares mais determinados (a determinação seria uma característica foliar, segundo os morfologistas clássicos) ou folhas que expressaram mais características caulinares. Ao contrário do que possa parecer, isto não representa uma antítese, mas sim uma síntese do que é a folha, com sua gradação entre porções mais axiais e indeterminadas (como base e a raque da folha composta) e porções dorsiventrais e determinadas (como as margens dos folíolos).

Em Sapindales, essas condições também convivem com séries heteroblásticas. Enquanto *Guarea* apresenta suas primeiras folhas simples, com um aumento gradual do número de folíolos até grandes folhas pinadas (Steingraeber and Fisher, 1986), *Murraya* apresenta redução gradual na quantidade de folíolos relacionada a hormônios florígenos atuantes no início da fase floral (Efroni et al., 2010). O mesmo acontece em outros grupos, como com a rosa de jardim (*Rosa* spp., Rosaceae), e podemos notar que isso ocorre no momento de transição para um es-

tágio de maior determinação do sistema caulinar: o surgimento de um ramo reprodutivo (Shalit et al., 2009).

No presente trabalho, observamos a iniciação lateral de primórdios de folíolos, com a porção distal do primórdio foliar determinando-se como folíolo terminal. Em espécies com um folíolo, como *Metrodorea maracasana*, *Esenbeckia leiocarpa* e *E. grandiflor*a, a determinação é mais precoce que nas demais espécies e apenas o folíolo terminal expande-se. Em *E. pilocarpoides*, Kaastra (1982) descreve duas subespécies: *E. pilocarpoides* subsp. *pilocarpoides* e *E. pilocarpoides* subsp. *maurioides* Kaastra. Na primeira, as folhas são uniformemente unifolioladas (caracterizando o material estudado) e na segunda, os folíolos variam de um a três por folha. As projeções pareadas na base dos primórdios foliares ora observadas na subespécie típica podem corresponder a primórdios de folíolos que concluíram seu desenvolvimento em um estágio muito precoce (antes de se expandirem, como se expande o folíolo terminal), não sendo evidentes posteriormente na folha adulta, ao contrário do que deve ocorrer em *E. pilocarpoides* subsp. *maurioides*, nos quais os folíolos laterais podem vir a se expandir completamente.

Tanto folhas simples (*Raulinoa echinata* e *Esenbeckia leiocarpa*) como folhas unifolioladas (*Metrodorea macarasana*, *E. grandiflora* e *E. pilocarpoides*) possuem essencialmente a mesma estrutura e desenvolvimento nas espécies estudadas que não apresentam heterofilia, possivelmente devido à determinação precoce do primórdio foliar. Constrições e intumescimentos, tidos como responsáveis pela articulação que caracterizariam uma folha unifoliolada (Kubitzki et al., 2011) desenvolvem-se posteriormente à origem de primórdios de folíolos, tanto em folhas simples como em folhas compostas, e não estão diretamente ligados à redução do número de folíolos, provavelmente sendo responsáveis apenas por um redirecionamento da lâmina foliar em resposta a exposição luminosa ou por gerar regiões de abscisão. Não são necessariamente homólogos filogeneticamente ou estruturalmente, mas são de grande utilidade na identificação e delimitação de espécies. Nessas condições, o termo folha unifoliolada é adequadamente aplicado para uma descrição macroscópica, quando detalhado o tipo de articulação presente. No entanto, o registro da informação evolutiva relevante na história do grupo: hipótese explícita de descendência comum a partir de um ancestral possuidor de folhas compostas, sinapomorfia de Sapindales (Stevens, 2001 onwards), é evidente apenas com um estudo filogenético.

Embora nos gêneros estudados não tenha sido apontada uma série heteroblástica relacionada às fases da vida da planta, a variação do número de folíolos por folha em *Metrodorea* representa um clássico caso de heterofilia. Com base nos resultados obtidos, pode-se elaborar uma hipótese para explicar este fenômeno. As estruturas cuculadas pareadas das bases das folhas geram um espaço interno, mas limitado, para o desenvolvimento das folhas mais jovens. Em *M. nigra* encontramos possíveis rudimentos de um terceiro folíolo em folhas bifolioladas em desenvolvimento, completamente circundados por primórdios de folhas com lâmina foliar em desenvolvimento (Fig. 36), bem como folíolos laterais bastante reduzidos em folhas de *M. mollis* que pareceram concluir sua histogênese antes da expansão da lâmina foliar em seu pleno tamanho (Fig. 41). Em *M. flavida*, encontramos um primórdio de folíolo lateral distintamente menor que os demais, sem o encaixe obvoluto, provavelmente em decorrência da ausência de espaço para sua expansão, o que dá mais apoio à ideia da barreira mecânica. Embora em *M. stipularis* não tenhamos observado rudimentos de folíolos, a existência de indivíduos com folhas bifolioladas indica situação semelhante. O possível aborto do folíolo mediano no gênero é relatado na literatura sobre o gênero (e.g. Engler, 1931; Dias et al., 2013), no entanto nosso trabalho atesta rudimentos de folíolos correspondentes aos laterais, que devem representar um estágio anterior ao aborto.

Desta forma, embora a formação de folhas compostas possa ser uma especialização interessante, sem o espaço necessário para uma correta expansão (devido a uma estrutura limitante, como a estrutura cuculada de *Metrodorea* ou mesmo primórdios foliares de *Esenbeckia*) pode ocorrer um desvio do programa de desenvolvimento de alguns folíolos, implicando em uma possível perda ou atrofia das estruturas. O encaixe obvoluto representaria, então, a condição ideal para expansão e quando não realizado com sucesso no início da expansão da lâmina foliar pode vir a gerar as condições que limitariam o desenvolvimento. A perda de folíolos em desenvolvimento, contraposta à função protetora da bainha, pode ter gerado uma pressão seletiva que favoreceu o estabelecimento de indivíduos que não produzissem folíolos laterais, dando origem às espécies consistentemente unifolioladas de Rutaceae (indivíduos com determinação precoce do desenvolvimento foliar), como *M. maracasana,* ou predominantemente unifolioladas, como *M. concinna* Pirani & P.Dias. Esta restrição espacial pode ainda ser responsável pela

assimetria encontrada na base dos folíolos laterais (Fig. 46).

Desta forma, nas espécies estudadas, encontramos dois tipos de folhas unifolioladas, para qual sugerimos a seguinte terminologia: *(i) folhas unifolioladas precoces*, cuja porção terminal do primórdio foliar torna-se a única lâmina foliar distinta e é determinada antes da produção de pares de folíolos proximais (que correspondem aos primórdios laterais), exibindo aspecto igual às folhas simples. *(ii) folhas unifolioladas tardias*, produzidas pelo aborto dos folíolos ao longo do desenvolvimento de um primórdio foliar que produz mais de um primórdio de folíolo. O termo tardio também seria adequado à condição adulta bifoliolada em folhas que apresentavam três primórdios de folíolos.

A base da folha não é perfeitamente radial, apresentando assimetria dorsiventral na estrutura vascular. No entanto, mesmo não apresentando uma perfeita radialidade, sua condição axial e o cilindro vascular a aproxima de características caulinares, contínuo com o sistema vascular do caule e das regiões das nervuras centrais dos folíolos, com as devidas reorganizações em zonas de transição (região do nó e saída de folíolos). A base da folha, que não possui características laminares (não há meristema marginal envolvido em sua formação), pode ser mais ou menos alongada, de acordo com seu crescimento. Quando alongada e canaliculada a cilíndrica, facilmente a identificamos como pecíolo, que pode apresentar alguma especialização, como é evidente em *Raulinoa echinata*, que compartilha características com *Metrodorea*, como longos tricomas promovendo adesão das bases de folhas. Já em *M. stipularis*, o pecíolo, tratado na literatura como completamente coalescente com a bainha (Kaastra 1977) ou aparentemente ausente (Kaastra 1982) corresponde, na verdade, a toda a porção da base da folha, muito curta, mas que não se prolonga acima da estrutura cuculada. Kubitizki et al. (2011) tratam a bainha de *Metrodorea* como peciolar, no entanto sua morfologia ainda é muito destoante das bainhas comumente encontradas em muitos outros grupos de plantas vasculares.

A base da folha de *Metrodorea* apresenta no início do seu desenvolvimento duas enações laterais, muito semelhantes a primórdios de folíolos, que se unem pelo crescimento da porção adaxial da base da folha entre elas, por meio do crescimento do córtex, dando origem à estrutura cuculada. Divisões anticlinais da camada L_2 promovem o crescimento de praticamente todo o córtex nesta região, já que as fileiras radiadas de célula são observadas da protoderme

ao sistema provascular. Kaastra (1977) defende nomear a estrutura como bainha, tendo como argumento ser um crescimento da base foliar. No entanto, a origem desta estrutura não é de origem de um crescimento intercalar como as bainhas típicas conhecidas em monocotiledôneas. Estruturas semelhantes, como as de bases foliares de plantas do gênero *Clusia* e *Garcinia* (Fig. 49, Clusiaceae) são descritas como pecíolos escavados (Stevens, 2007; Bell and Bryan, 2008), embora esta terminologia não faça referência à expansão adaxial presente na base da folha. Enações da base da folha, tipicamente pareadas, mas podendo sofrer alterações ao longo do desenvolvimento tornando-se fundidas e protegendo gemas são comumente chamadas de estípulas (Lubbock, 1899; Sinnott and Bailey, 1914; Bell and Bryan, 2008) e este parece ser o termo mais adequado para a projeção adaxial de *Metrodorea*, de posição intrapeciolar, que forma a estrutura cuculada junto à porção proximal do pecíolo, canaliculada. Estípulas conadas de posição intrapeciolar em plantas de folhas opostas são encontradas em Malpighiaceae (Cronquist, 1981; Stevens, 2001; Anderson, 2007, Fig. 50). Apresenta também semelhança com as estípulas intrapeciolares das famílias de folha alterna Araliaceae (Figs. 51-52), que correspondem a um par de estípulas fundidas em apêndices ligulares (Plunkett et al., 2005), e Erythroxylaceae (Cronquist, 1981).

A relação das estípulas com a base da folha pode ser entendida ao considerarmos as ideias de Arber (1950) sobre paralelismo entre órgãos laminares com as respectivas estruturas radiais que os sustentam: "*the relation of the stipules to the leaves of which they are members, may be compared with the relation of cotyledons to the primary shoot, and of prophylls or bracteoles to a lateral shoot*". Logo, podemos comparar os primórdios proximais que formam estípulas com os primórdios distais que formam folíolos. A fusão de estípulas é muito relatada em vários grupos (Lubbock, 1899), como os já citados acima, embora estudos de ontogenia demonstrando esta fusão sejam escassos. União de peças laminares é ainda relatada em folíolos proximais de folhas compostas de *Tropaeolum pentaphyllum* (Tropaeolaceae) (Arber, 1950) e fartamente reconhecida entre peças florais (Weberling, 1989).

Notadamente, isso exigiria a produção de mais enações laterais nos primórdios de folhas de *Metrodorea* do que os correspondentes ao número básico de folíolos nas folhas expandidas e é o que de fato ocorre. Embora as folhas neste gênero tenham no máximo três folíolos, algumas

espécies do gênero proximamente relacionado *Esenbeckia* caracterizam-se por possuir cinco folíolos em disposição palmada (Kaastra, 1982), fato observado também em outros gêneros da família como *Conchocarpus, Neoraputia, Raputiarana e Casimiroa.* Já folhas pinadas com poucos a numerosos folíolos são amplamente encontradas na família. Tanta variação de números e disposição de folíolos em Rutaceae parece expressar a capacidade de seus representantes de manter um maior período de indeterminação do ápice do primórdio foliar, permitindo criar mais estruturas oriundas de enações laterais. Embora Sapindales seja tradicionalmente tida como um grupo sem estípulas, é notório que essas estruturas surgiram independentemente diversas vezes ao longo da evolução das angiospermas e apresentam variáveis graus de homologia nos grupos em que ocorrem (Ilic et al., 2007). Nesta concepção, representariam uma autapomorfia de *Metrodorea*. A vascularização oriunda dos traços laterais relacionados à anatomia nodal trilacunar com três traços é atestada por Kaastra (1977) e tida como relacionada a estípulas em muitas angiospermas (Lubbock, 1899; Sinnott and Bailey, 1914; Majumdar, 1955).

Quanto à adesão entre as estípulas de *Metrodorea* e da porção proximal do pecíolo de *Raulinoa* por tricomas, dispomos de bons termos usuais na literatura floral. Weberling (1989) descreve a união entre peças florais por células entremeantes da epiderme (*interlocking cells*), que podem ser tricomas longos que sofrem entrelaçamento (*capillinection*) ou células papilosas e porções da cutícula que sofrem denteação (*dentonection*). Em todas as espécies de *Metrodorea* e *Raulinoa* encontramos os casos de entrelaçamento, enquanto nas margens de *M. mollis* e *M. flavida*, células papilosas e tricomas curtos indicam uma condição intermediária entre denteação e entrelaçamento. União de pétalas por denteação de células epidérmicas já foi reportada em Rutaceae no gênero *Correa* (Hartl, 1957; Weberling, 1989), enquanto a presença de células epidérmicas entremeantes é responsável pela aderência e coerência entre peças florais de algumas Rutaceae da subtribo Galipeinae (Pirani et al., 2010; El Ottra et al., 2013). Trata-se, portanto, de processos geradores de estruturas unidas e tubulosas variadamente explorado na história evolutiva da família.

Convém ressaltar que as margens da lâmina foliar são formadas por regiões meristemáticas marginais, as quais muitos autores preferencialmente chamam de blastozonas (Hagemann and Gleissberg, 1996), de estrutura semelhante ao encontrado na maior parte das angiospermas

não monocotiledôneas. Duas camadas externas contínuas com a célula marginal correspondem a protoderme, e três camadas internas oriundas da célula submarginal são, por vezes, chamadas de promesofilo, sendo que a camada mais interna responsável pela formação de cordões de tecido provascular (Beck, 2010). Embora normalmente a literatura considere a formação de folíolos em folhas compostas como um sistema de fracionamento do meristema marginal (Hagemann and Gleissberg, 1996; Beck, 2010), os primórdios de folíolos nas espécies estudadas são formados anteriormente, por meio de enações com características histológicas distintas das regiões de crescimento marginal observadas. Mesmo regiões responsáveis pela formação dos primórdios de folíolos observados por Lacroix & Sattler (1994) não possuem características semelhantes ao do meristema marginal por nós observado.

Em resumo, o desenvolvimento de folhas compostas nas espécies já estudadas de Rutaceae não deve ser compreendido como um sistema de fracionamento do meristema marginal. Com apoio da abordagem contínua (Sattler, 1996), propriamente chamada *fuzzy Arberian morphology* (Rutishauser and Isler, 2001) em homenagem a Agnes Arber, podemos entender essas folhas como semelhantes a um sistema caulinar reduzido que pode produzir variável quantidade de folíolos antes que seu ápice se determine como folíolo terminal, o que pode acontecer rapidamente produzindo a folha unifoliolada precoce. Em *Metrodorea,* as enações laterais normalmente se desenvolvem como folíolos, mas as duas proximais se desenvolvem em estípulas que sofrem fusão originando uma estrutura cuculada peculiar. Tais enações podem se desenvolver em estruturas plenas ou serem abortadas. O eixo que sustenta os folíolos, em paralelismo (sensu Arber, 1950) ao caule, é a base foliar, entendida como pecíolo no grupo. O entrelaçamento de tricomas promovendo adesão entre estruturas adjacentes é novamente relatado nesta família, mas desta vez em órgãos vegetativos.

Agradecimentos

Os autores são gratos à FAPESP e à CAPES pelo auxílio financeiro e às contribuições de Juliana El Ottra em discussões referentes ao trabalho. Adicionalmente agradecemos, pela autoria de imagens, os fotógrafos Alex Popovkin (Fig. 2; fotografada na Mata Atlântica, nordeste da

Bahia) e a Vitor Barão (Figs. 49-52, material coletado no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo).

Referências

Anderson, W.R. 2007. Notes on neotropical Malpighiaceae - IX. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 25: 95–111.

Arber, A. 1950. The Natural Philosophy of Plant Form. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Beck, C.B. 2010. An introduction to plant structure and development: plant anatomy for the twenty-first century. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Bell, A.D., and A. Bryan. 2008. Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology. 2nd ed. Timber Press, Inc., Portland . London.

Bharathan, G., T.E. Goliber, C. Moore, S. Kessler, T. Pham, and N.R. Sinha. 2002. Homologies in leaf form inferred from KNOXI gene expression during development. *Science* 296: 1858–1860.

Bukatsch, F. 1972. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 61: 255.

Champagne, C., and N. Sinha. 2004. Compound leaves: equal to the sum of their parts? *Development* 131: 4401–12.

Champagne, C.E.M., T.E. Goliber, M.F. Wojciechowski, R.W. Mei, B.T. Townsley, K. Wang, M.M. Paz, et al. 2007. Compound leaf development and evolution in the legumes. *The Plant cell* 19: 3369–78.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.

DeMason, D.A., and P.J. Villani. 2001. Genetic Control of Leaf Development in Pea (*Pisum sativum*). *International Journal of Plant Sciences* 162: 493–511.

Dias, P., R.G. Udulutsch, and J.R. Pirani. 2013. A new species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil: morphology, molecular phylogenetics, and distribution. *Phytotaxa* 117: 35–41.

Eames, A. 1961. Morphology of the angiosperms. McGraw-Hill, New York.

Efroni, I., Y. Eshed, and E. Lifschitz. 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *The Plant Cell* 22: 1019–32.

Engler, A. 1931. Rutaceae. *In* Engler, A; Prantl, K. (eds.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien., 187–359. Velag Von Wiilhelm Engelmann, Leipizig.

Friedman, W.E.F., R.C. Moore, and M.D. Purugganan. 2004. The evolution of plant development. *American Journal of Botany* 91: 1726–1741.

Gadek, P., E. Fernando, and C. Quinn. 1996. Sapindales: molecular delimitation and infraordinal groups. *American Journal of Botany.* 83: 802–811.

Groppo, M., J.R. Pirani, M.L.F. Salatino, S.R. Blanco, and J.A. Kallunki. 2008. Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany* 95: 985–1005.

Hagemann, W., and S. Gleissberg. 1996. Organogenetic capacity of leaves: the significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 199: 121–152.

Hareven, D., T. Gutfinger, a Parnis, Y. Eshed, and E. Lifschitz. 1996. The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato. *Cell* 84: 735–44.

Hartl, D. 1957. Die Pseudosympetalie von Correa speciosa (Rutaceae) und Oxalis tubiflora (Oxalidaceae). *Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse, Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz* 2:1-13.

Ilic, K., E. a Kellogg, P. Jaiswal, F. Zapata, P.F. Stevens, L.P. Vincent, S. Avraham, et al. 2007. The plant structure ontology, a unified vocabulary of anatomy and morphology of a flowering plant. *Plant Physiology* 143: 587–99.

Johansen, D.A. 1940. Plant microtechinique. McGraw - Hill Book Co. Inc., New York.

Kaastra, R.C. 1977. Leaf sheaths and obturators in Rutaceae - Pilocarpinae. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen* 53: 317–320.

Kaastra, R.C. 1982. Pilocarpinae (Rutaceae). *Flora Neotropica* 33: 1–197.

Kaplan, D.R. 2001. Fundamental concepts of leaf morphology and morphogenesis : a contribution to the interpretation of molecular genetic mutants. *International Journal of Plant Sciences* 162: 465–474.

Kirchoff, B. 2001. Character description in phylogenetic analysis: insights from Agnes Arber's concept of the plant. *Annals of Botany* 88: 1203–1214.

Kubitzki, K., J.A. Kallunki, M. Duretto, and P.W. Wilson. 2011. Rutaceae. *In* K. Kubitzki [ed.]- The families and genera of vascular plant Vol. 10: Flowering Plants. Eudicots: Sapindales,

Cucurbitales, Myrtaceae., 276–356. Springer, Berlin.

Lacroix, C.R., and R. Sattler. 1994. Expression of shoot features in early leaf development of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Canadian Journal of Botany* 72: 678–687.

Lubbock, J. 1899. On buds and stipules. Kega Paul, Trench, Thübner and Co. London.

Majumdar, G.P. 1955. The complete foliage leaf. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences* 42: 65–72.

El Ottra, J.H.L., J.R. Pirani, and P.K. Endress. 2013. Fusion within and between whorls of floral organs in Galipeinae (Rutaceae): structural features and evolutionary implications. *Annals of Botany* 111: 821–37.

Pirani, J.R., J.H.L. El Ottra, and N.L. Menezes. 2010. Morfoanatomia da flor de cinco espécies de *Galipea* Aubl. e seu significado na evolução de flores tubulosas entre as Rutaceae neotropicais. *Revista Brasileira de Botânica* 33: 301–318.

Plunkett, G.M., P.P. Lowry II, D.G. Frodin, and J. Wen. 2005. Phylogeny and geography of Schefflera: pervasive polyphyly in the largest genus of Araliaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 92: 202–224.

Radford, A.E., W.C. Dickison, J.R. Massey, and C.R. Bell. 1974. Vascular plant systematics. Harper and Row.

Rutishauser, R., and B. Isler. 2001. Developmental genetics and morphological evolution of flowering plants, especially bladderworts (*Utricularia*): fuzzy Arberian morphology complements classical. *Annals of Botany* 88: 1173–1202.

Sattler, R. 1996. Classical morphology and continuum morphology: opposition and continuum. *Annals of Botany* 78(5):577–581.

Shalit, A., A. Rozman, A. Goldshmidt, J.P. Alvarez, J.L. Bowman, Y. Eshed, and E. Lifschitz. 2009. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8392–7.

Silveira, M. 1989. Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. *In* Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica, 71–79. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sinha, N. 1997. Simple and compound leaves: reduction or multiplication? *Trends in Plant Science* 2:

396–402.

Sinnott, E.W., and I.W. Bailey. 1914. Investigations on the phylogeny of the angiosperms. 3. Nodal anatomy and the morphology of stipules. *American Journal of Botany* 1: 441–453.

Skutch, A.F. 1946. A compound leaf with annual increments of growth. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 73: 542–546.

Steingraeber, D., and J. Fisher. 1986. Indeterminate growth of leaves in *Guarea* (Meliaceae): a twig analogue. *American Journal of Botany* 73: 852–862.

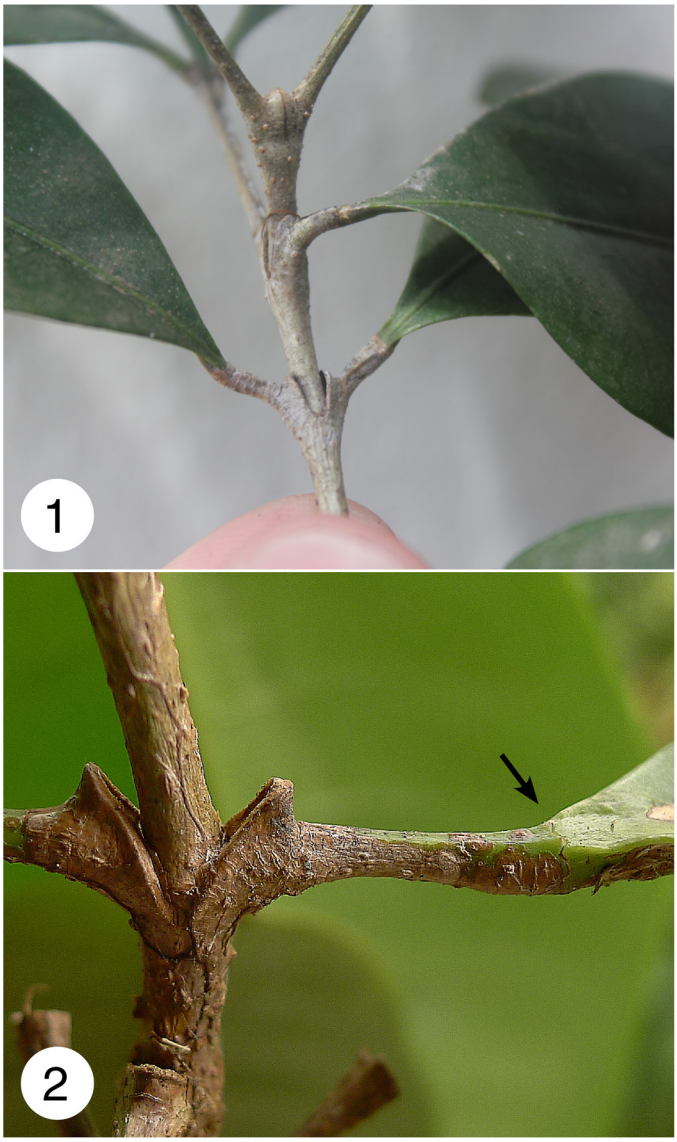
Stevens, P.F. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. *Version 12, July 2012*. Available at: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/

Stevens, P.F. 2007. Clusiaceae - Guttiferae. *In* K. Kubitzki [ed.] - The families and genera of vascular plant Vol. 9: Flowering Plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae All, 48–66. Springer, Berlin.

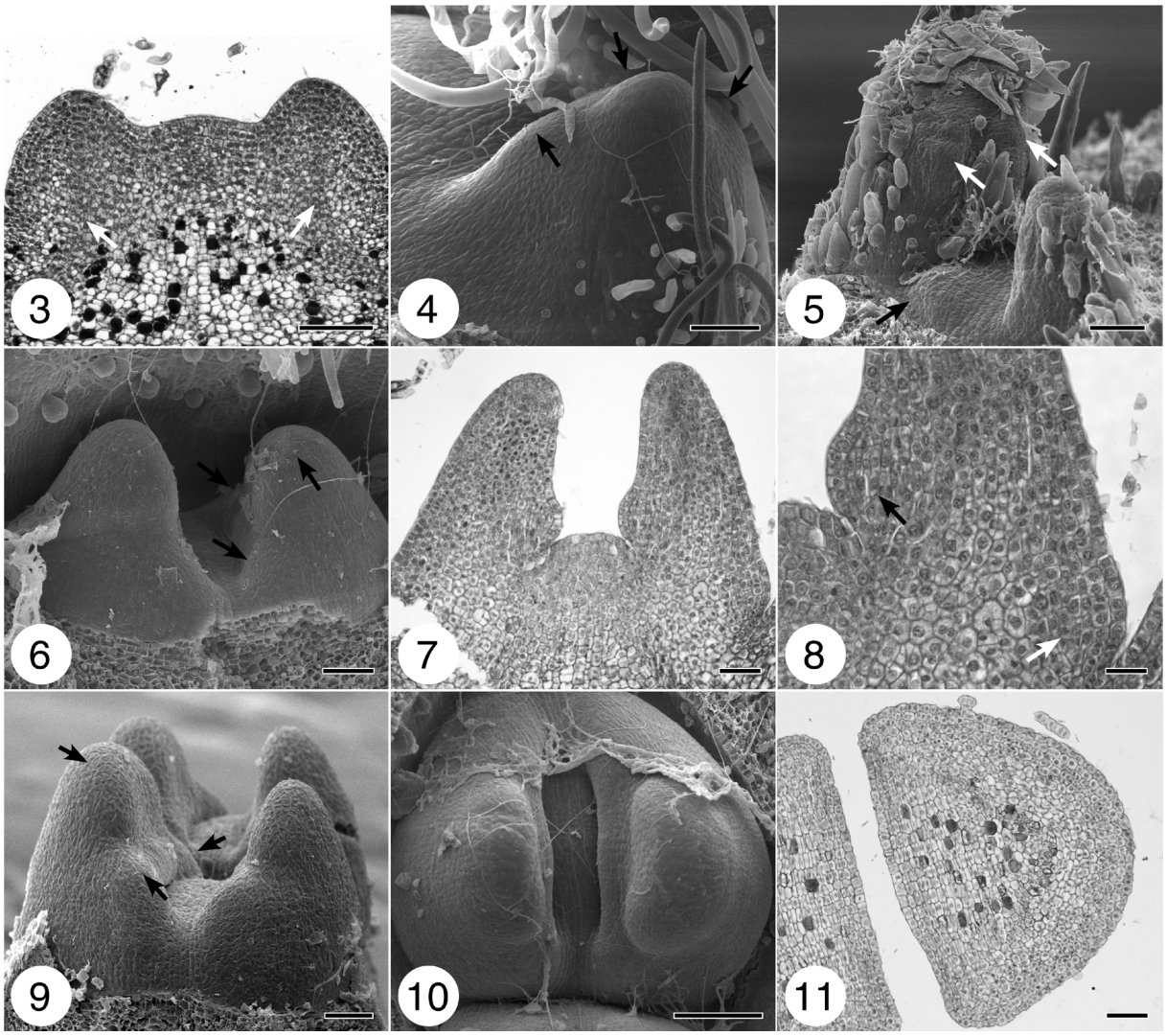
Warman, L., A.T. Moles, and W. Edwards. 2011. Not so simple after all: searching for ecological advantages of compound leaves. *Oikos* 120: 813–821.

Weberling, F. 1989. Morphology of Flowers and Inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge.

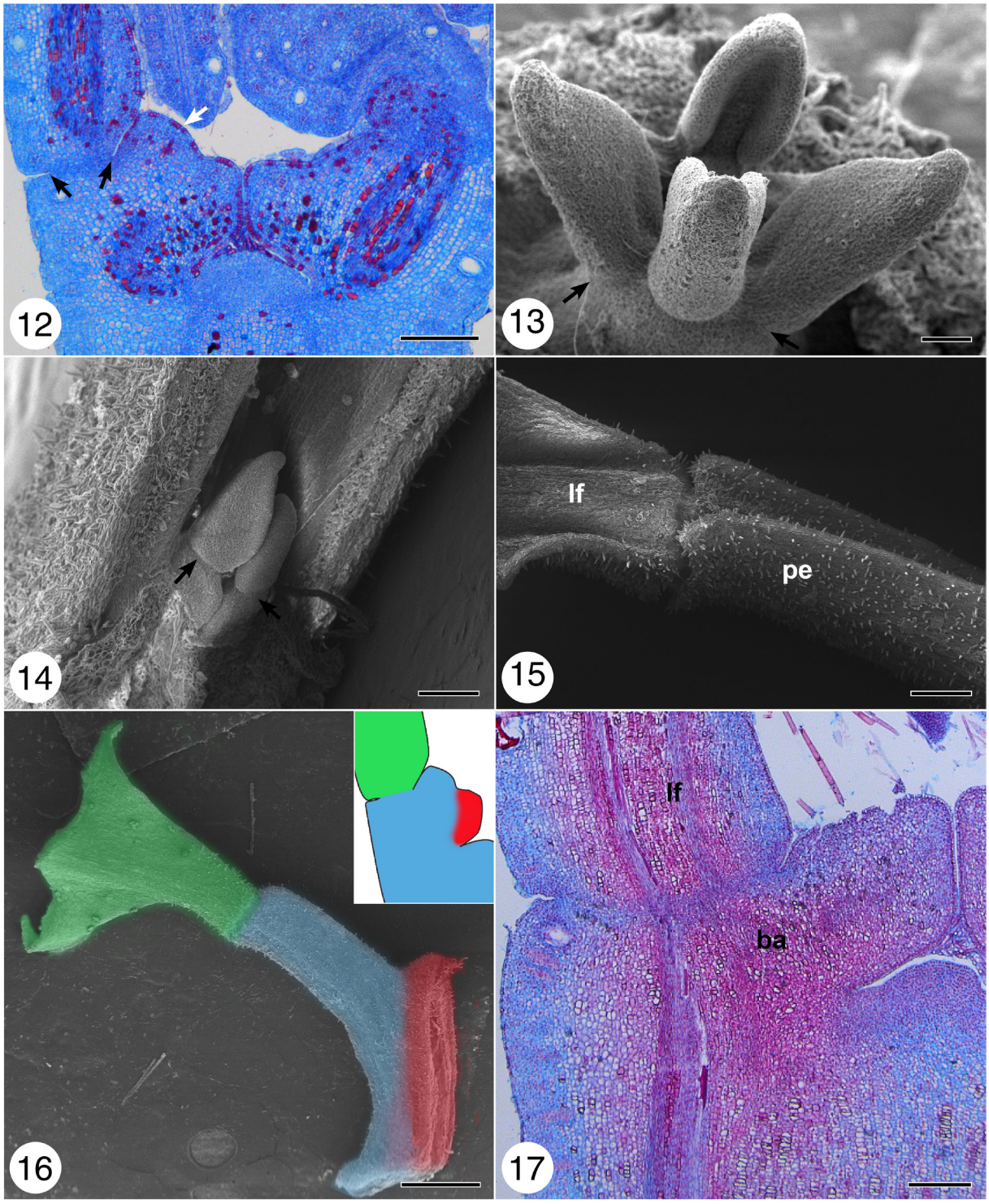
Figuras 1-2. *Metrodorea*, morfologia da folha. **1.** *Metrodorea nigra*. Ramo com o ápice protegido pelas bainhas das folhas mais apicais e bainhas separadas entre si no segundo e terceiro nó. **2.** *Metrodorea maracasana*. Nó com folhas opostas. A articulação entre base de folha e lâmina é indicada por seta.


1
2

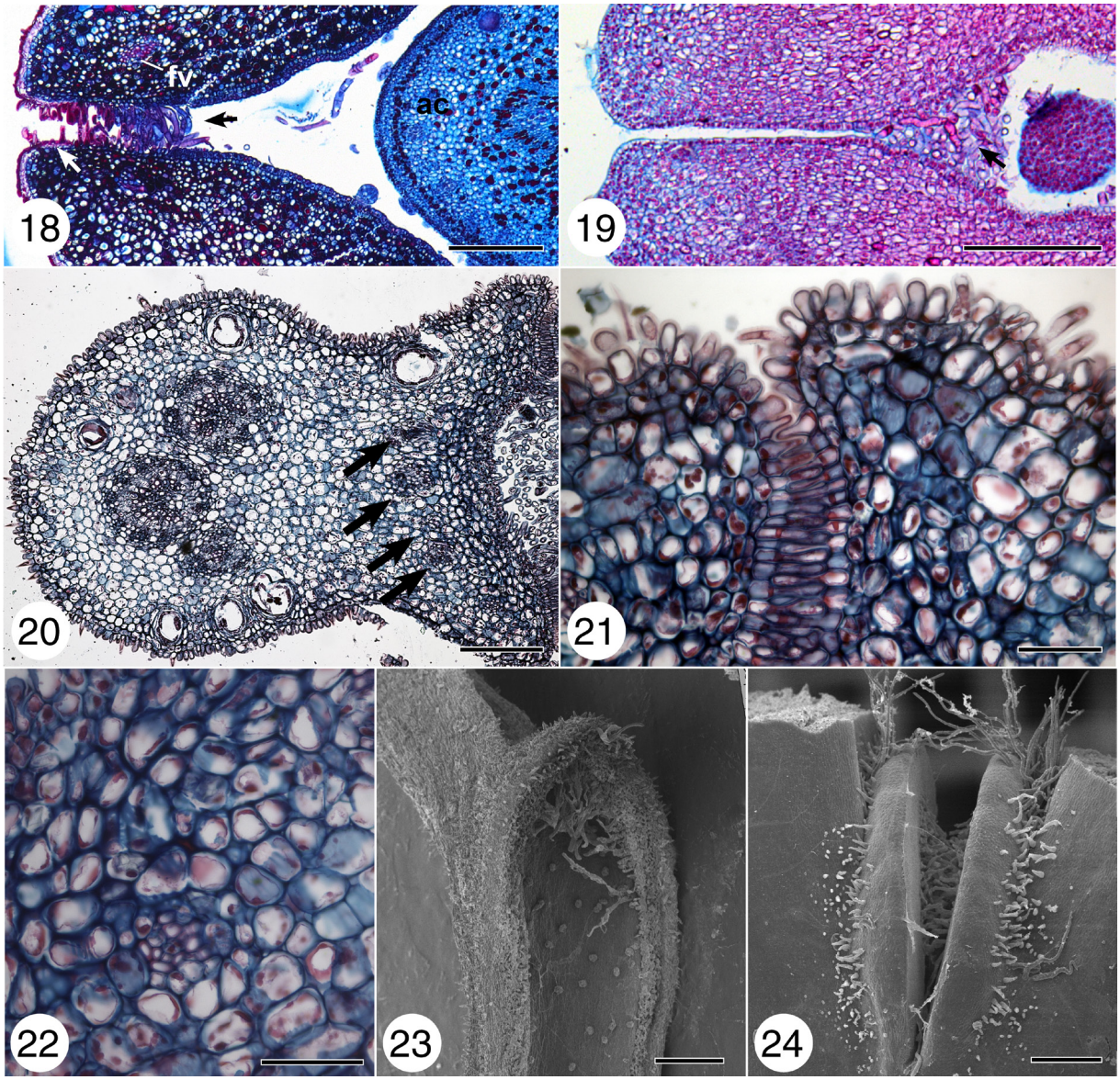
Figuras 3-11. Estágios iniciais da morfogênese foliar. **3.** *Metrodorea flavida*. Secção longitudinal. Cordões de procâmbio (setas) representam o início de diferenciação do sistema caulinar entre a base dos primórdios foliares opostos e o caule. **4.** *Esenbeckia irwiniana.* MEV. Primórdio foliar com três enações (setas), representando o início do desenvolvimento dos três folíolos. **5.** *E. pilocarpoides*. Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Ápice apresentando primórdio foliar, recoberto por tricomas, com duas enações laterais (setas branca) e um primórdio foliar em início de morfogênese (seta preta). **6-10.** *M. maracasana*. **6.** MEV. Os primórdios foliares desta espécie de folhas unifolioladas também apresentam três enações (setas). **7-8.** Secção longitudinal. **7.** Primórdios foliares evidentemente opostos com projeção na região dos primórdios junto ao ápice (região adaxial). **8.** Em detalhe da figura anterior, identificamos que as divisões periclinais da camada L_2 (seta preta) são responsáveis pelo crescimento adaxial. Embora haja algum crescimento abaxial junto à região proximal do primórdio (seta branca), neste caso não há divisões periclinais da camada L_2. **9-10.** MEV. **9.** Dois pares de primórdios foliares, com projeções adaxiais evidentes. **10.** As projeções adaxiais tornam-se indistintas das enações laterais, dando origem à estrutura cuculada que recobre o ápice meristemático. **11.** *M. nigra*. Secção transversal da base do primórdio do primórdio, onde são evidentes fileiras radiadas adaxiais de células e sistema vascular em diferenciação. **Barras:** 3, 10=100µm; 4-9, 11=50µm.


3
4
5
6
7
8
9
10
11

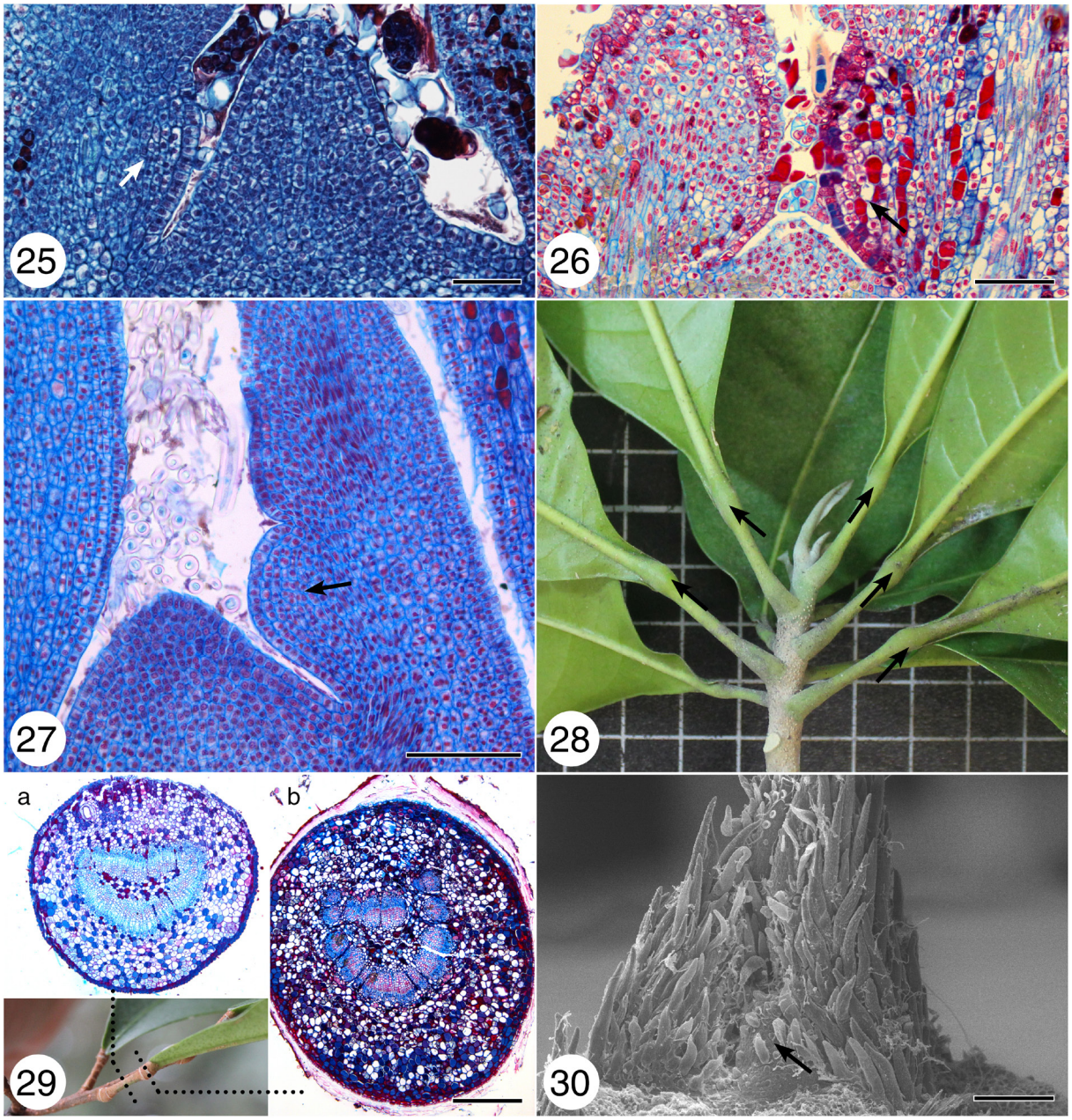
Figuras 12-17. Morfogênese em *Metrodorea*. **12-15**. *M. nigra*. **12.** Secção longitudinal. Ápice protegido por um par de folhas um pouco mais desenvolvidas. São evidentes constrição entre lâmina e base (setas pretas) e expansão (seta branca) acima da projeção adaxial formada anteriormente que contribuirá com a formação do pecíolo. **13-16.** MEV. **13.** Par de folhas trifolioladas, com folíolos laterais obvolutos entre as folhas opostas. Reentrâncias entre duas das lâminas foliares e a base são indicadas por setas. **14.** Par de folhas unifolioladas, em estágio mais avançado, alojadas na base protetora de uma folha expandida. A folha oposta a esta foi removida. Constrições indicadas por setas. **15.** Na folha plenamente desenvolvida, é possível observar a constrição entre pecíolo (pe) e lâmina foliar (lf). **16.** Em detalhe, no canto superior direito, um esquema representativo da Fig. 12. As cores indicam o destino de cada região: verde para lâmina foliar, azul para pecíolo e dorso da estrutura protetora, em evidente continuidade com o caule, e vermelho para a projeção adaxial da estrutura cuculada. **17.** Secção longitudinal de *M. stipularis*, da base (ba) articulada com a lâmina foliar (la) em uma das folhas do primeiro nó plenamente expandidas. Nesta espécie, não peciolada, embora constrição e a projeção adaxial sejam evidentes, não há entre elas a expansão do pecíolo. **Barras:** 12, 15, 17=200µm; 13=50µm; 14=100µm; 16=500µm.


12
13
14
lf
pe
15
16
lf
ba
17

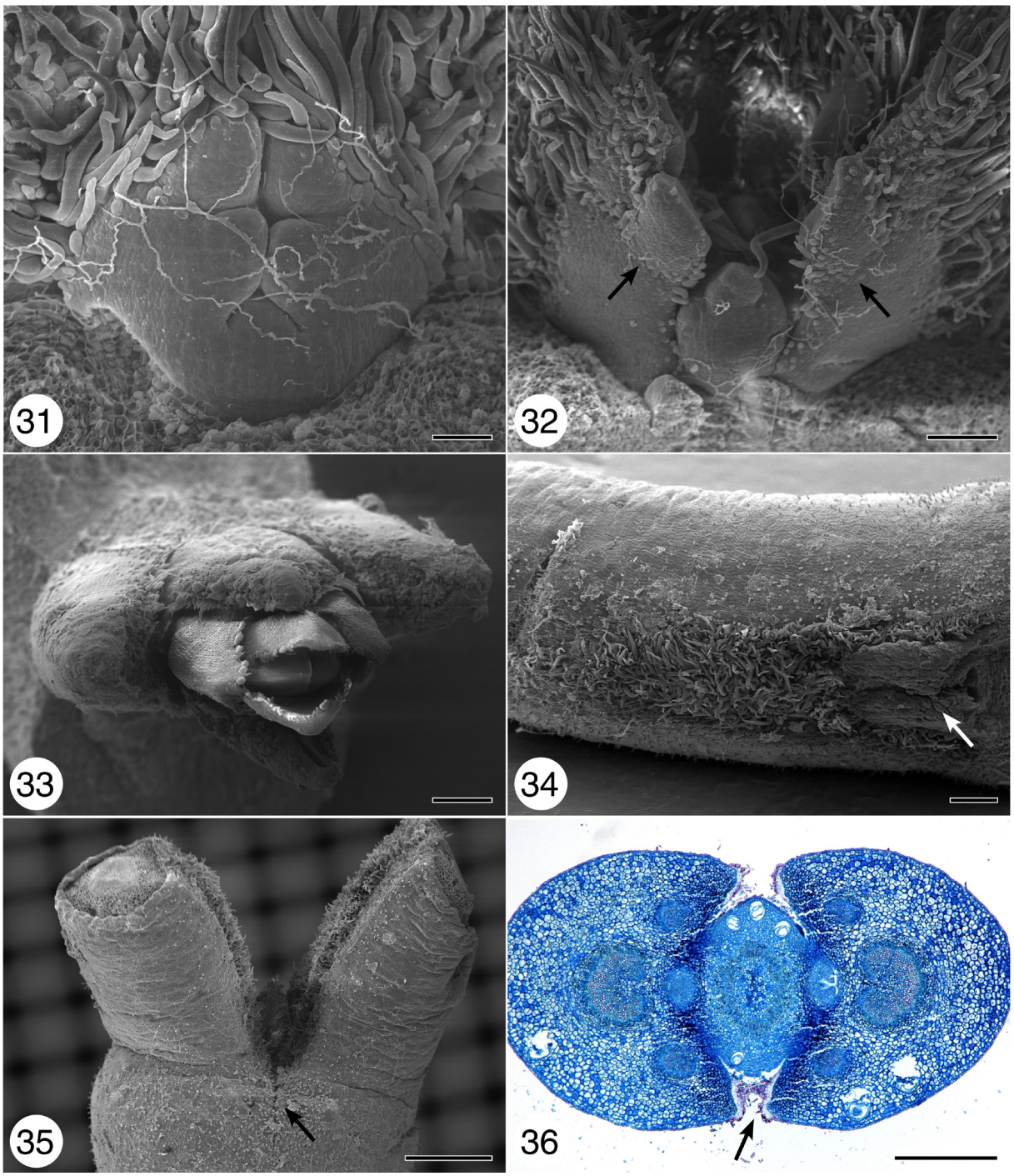
Figuras 18-24. *Metrodorea*, bases de folhas. **18-22.** Secções transversais. **18.** *M. flavida.* Protegendo o ápice caulinar (ac), observamos as bases de folhas com tricomas tectores curtos (seta branca), em epiderme persistente sobre periderme oriunda de felogênio subepidérmico. Quando unidos promovem adesão, reforçada por longos tricomas (seta preta) da porção interna e distal da estrutura protetora. Um pequeno feixe vascular colateral é indicado (fv). **19.** *M. stipularis*, com margens amplas, tem apenas adesão pelos tricomas longos (seta). **20-22.** *M. mollis*. **20.** A região como um todo é dotada de células papilosas, exceto nas margens, onde células entremantes (tricomas curtos) são primariamente responsáveis pela adesão. Feixes vasculares são visíveis na região adaxial (setas). **21.** Detalhes da adesão entre as margens, por células entremeantes. **22.** Um dos pequenos feixes vasculares da região adaxial. **23-24.** MEV. **23.** Base de folha de *M. nigra*, exibindo tricomas glandulares proximais e longos tricomas tectores distais. **24.** *M. maracasana*, com suas estruturas protetoras de margens amplas e glabras, tem adesão apenas por tricomas longos. **Barras:** 19-20, 23-24=200μm; 21-22=50μm.


fv
ac
18
19
20
21
22
23
24

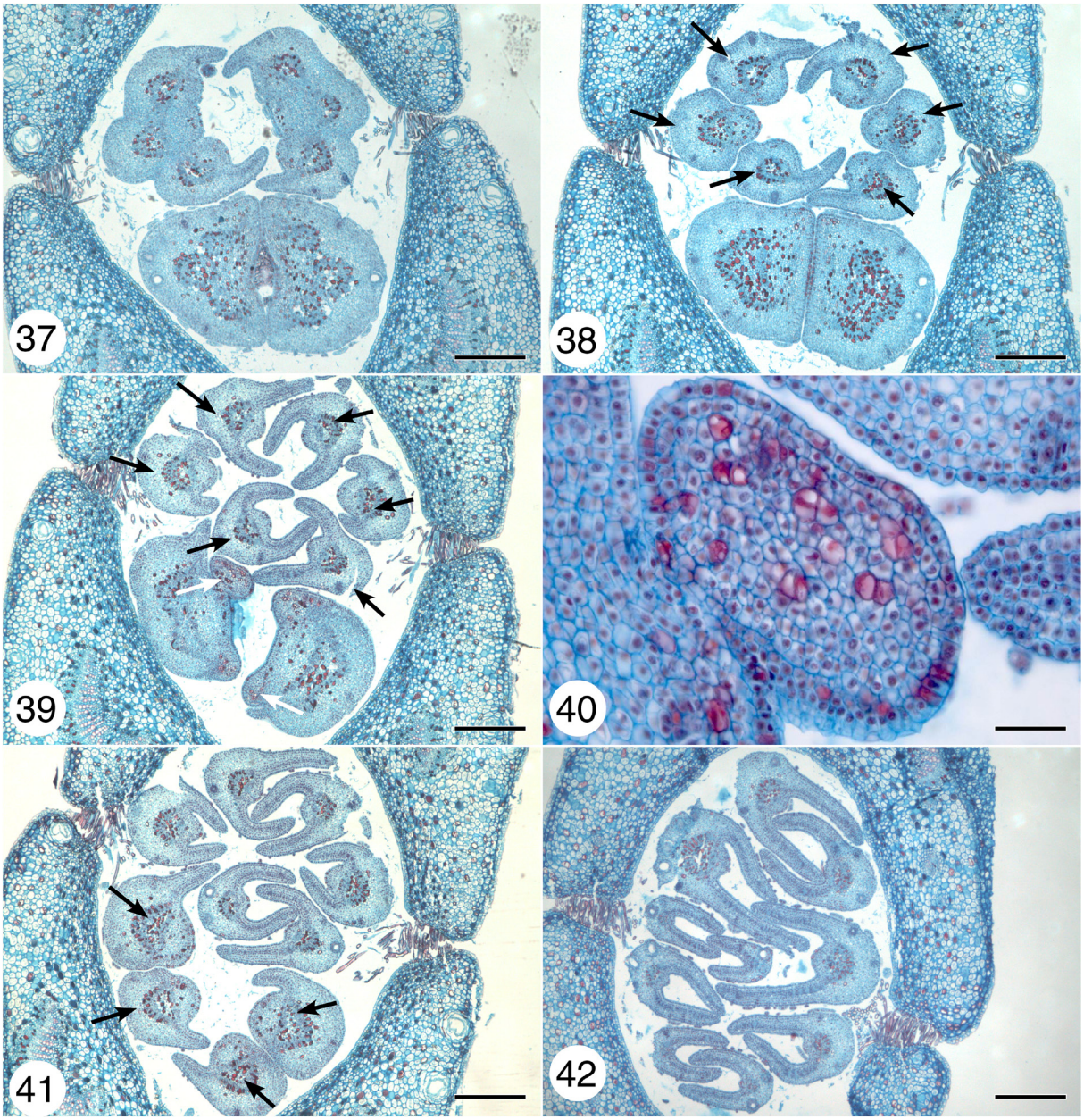
Figuras 25-30. Bases de folhas de *Esenbeckia*. **25-27.** Secções longitudinais do sistema caulinar. **25-26.** *E. pilocarpoides* (25) e *E. grandiflora* (26) com crescimento adaxial (seta) na base da folha em desenvolvimento. **27.** *E. irwiniana*. Primórdio de folíolo lateral indicado por seta. **28.** *E. leiocarpa* apresenta intumescimentos semelhantes ao das espécies unifolioladas (setas), mas neste caso as margens da lâmina são decurrentes ao lado da estrutura, visível apenas na face abaxial. **29.** *E. grandiflora* duas secções transversais de diferentes regiões do pecíolo: mediana (a) e distal e intumescida (b). A última apresenta maior proliferação do córtex e periderme. **30.** MEV. Em um estágio mais avançado de desenvolvimento, duas pequenas enações laterais são visíveis na base da folha de *E. pilocarpoides* (uma delas indicada por seta). **Barras:** 25=50µm; 26-27, 29=500µm para ambas as secções; 30=100µm


25
26
27
28
a
b
29
30

Figuras 31-36. Desenvolvimento em *Helietta apiculata* e *Raulinoa echinata*. **31-35.** MEV. **31-32.** Primórdios de folhas trifolioladas de *H. apiculata.* **31.** Inicialmente curvados sobre o ápice. **32.** Em estágio posterior, há o início da formação de constrições (setas). **33-36.** *R. echinata*. **33.** Ápice em roseta, com folhas decussadas. **34.** Região proximal e adaxial do pecíolo dotada de grande quantidade de tricomas longos, alojando gema axilar (seta). **35.** Bases de folhas pareadas (decussadas), unidas na base (seta). **36.** Secção transversal do ápice caulinar. A união é proporcionada por tricomas em epiderme persistente sobre periderme oriunda de felogênio subepidérmico (seta). **Barras:** 31=50µm; 32=100µm; 33-34=200µm; 35-36=500µm.


31
32
33
34
35
36

Figuras 37-42. *Metrodorea nigra*, cortes transversais em série, no sentido proximal-distal ou basal-apical do primórdio, do ápice caulinar protegido por duas bainhas de folhas opostas. **37.** Par de primórdios foliares oriundos do meristema apical caulinar, no lado superior da figura, mostrando região proximal à separação dos três folíolos; base de folhas de um par oriundo de gema axilar no lado inferior. **38-39.** Três primórdios de folíolos no lado superior da imagem individualizados (setas pretas). Na Fig. 39, já se observa a presença da lâmina foliar nos três folíolos das duas folhas no lado superior da imagem (setas pretas). Há expansões laterais nas bases das folhas bifolioladas indicando possíveis rudimentos de um terceiro folíolo (setas brancas). **40.** Detalhe de uma das estruturas apontadas por setas brancas na Fig. 39. **41.** Em uma região mais distal (apical) já se observa a completa distinção dos folíolos superiores (um par de folhas trifolioladas) e inferiores (setas pretas, um par de folhas bifolioladas). **42.** Protegidos pela estrutura cuculada estão, ao todo, dez primórdios de folíolos conduplicados entremeados entre si de forma obvoluta. **Barras:** 37-39, 41-42=300µm; 40=75µm.


37
38
39
40
41
42

Figuras 43-48. Estruturas foliares em *Metrodorea*. **43-44.** *M. mollis*. **43.** Par de folhas trifolioladas, sendo que em cada uma delas um dos três folíolos é atrofiado (setas). **44.** Secção transversal de um folíolo atrofiado em sua região mediana. **45.** *M. flavida.* MEV. Um primórdio de folíolo muito menor que os demais, pressionado sobre a superfície de outro, dentro da estrutura cuculada que foi removida, indicando uma possível barreira mecânica. **46.** Uma secção transversal de folha plenamente desenvolvida de *M. mollis*. **47-48.** Secções transversais de *M. nigra*. **47.** Folíolo em desenvolvimento, com a margem em início de formação. **48.** Ao centro, partindo da porção superior esquerda da foto, a margem de um folíolo um pouco mais desenvolvido que na Fig. 46. Notar que há uma camada subprotodérmica bem evidente, de origem de células submarginais. A que está voltada para a região adaxial (seta preta) dará origem ao parênquima paliçádico. Entre as camadas subprotodérmicas, o tecido sendo formado pelas células submarginais dá origem a cordões de procâmbio, um deles apontado por uma seta branca. **Barras:** 44-46=200μm; 47-48=50μm.

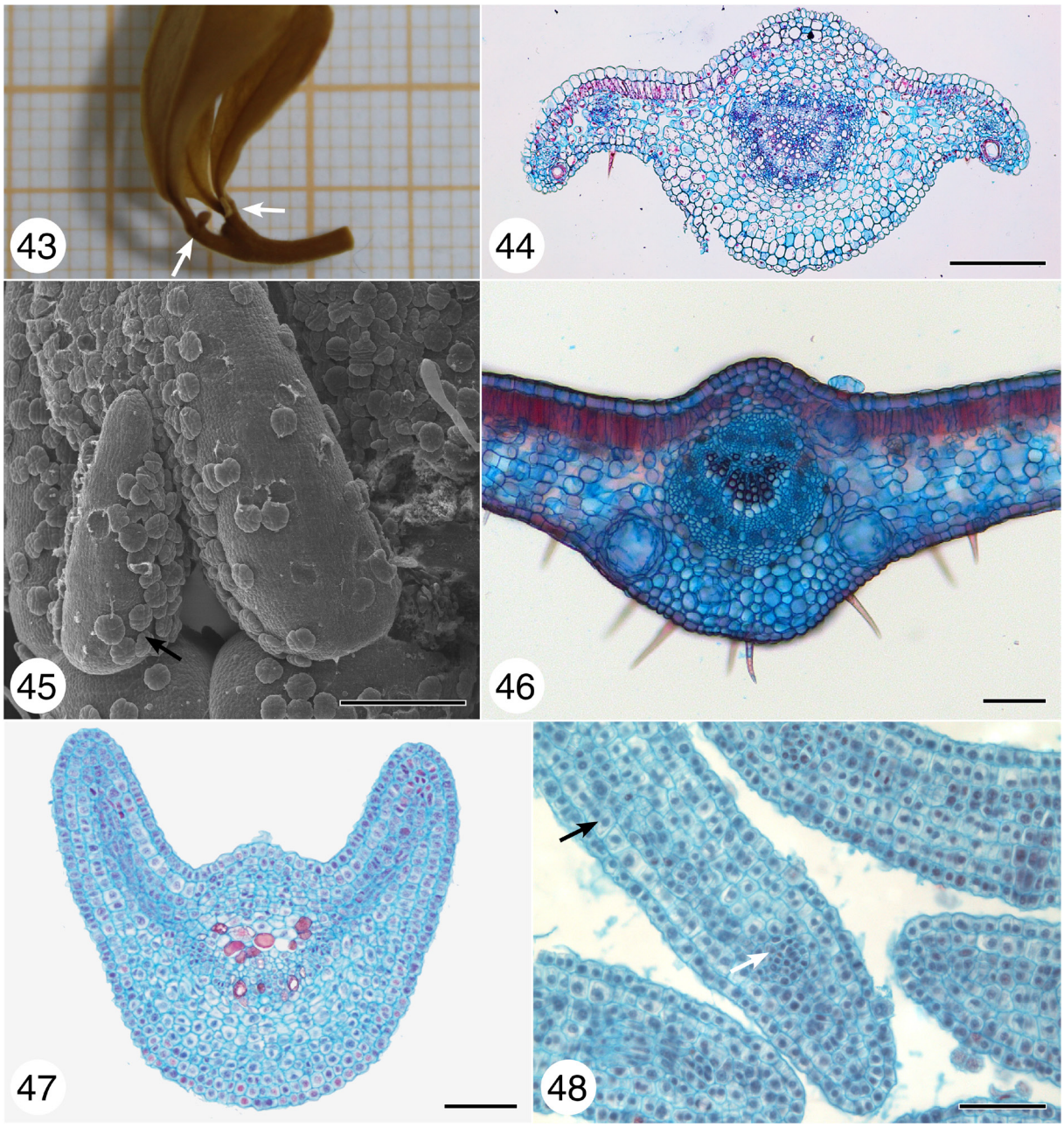
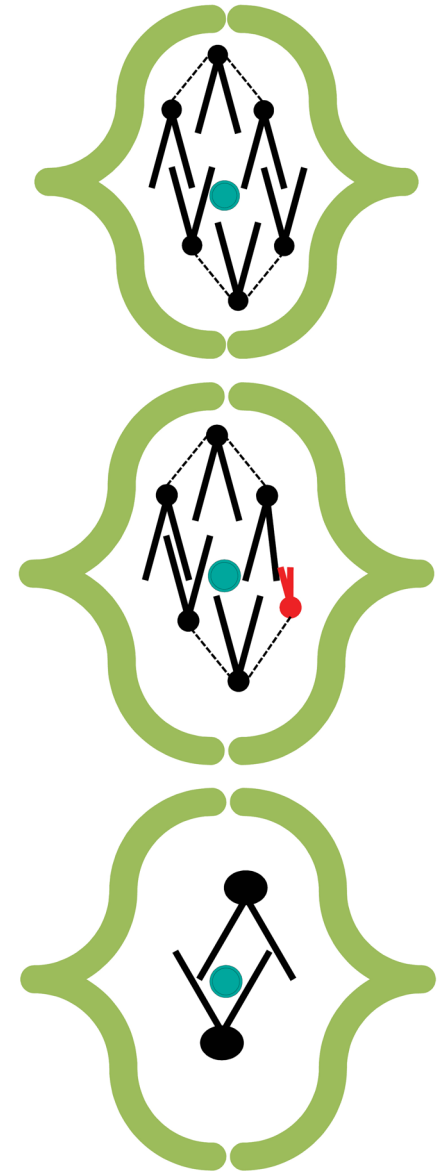

43
44
45
46
47
48

Figura 49. Hipótese para redução do número de folíolos em *Metrodorea*. Em uma situação ideal, os folíolos laterais realizam com sucesso o encaixe obvoluto e conseguem se expandir (a). Devido ao espaço limitado, folíolos que não realizam encaixe obvoluto podem ter seu desenvolvimento comprometido (b). A pressão seletiva exercida pela perda de folíolos durante o desenvolvimento pode ter acarretado uma seleção de indivíduos nos quais a produção de folíolos laterais foi inteiramente suprimida, gerando a condição estritamente unifoliolada observada em *M. maracasana* (c).


Estrutura cuculada da folha expandida
Primórdio de folíolo em desenvolvimento
Primórdio de folíolo com restrição mecânica de desenvolvimento
Meristema apical caulinar
Conexão entre folíolos (base da folha)

Figuras 50-53. Modificações da base de folha. **50.** *Garcinia* sp. (Clusiaceae). Pecíolos escavados, que no ápice protegem o ápice, de forma semelhante à *Metrodorea*. O termo, no entanto, não é adequado para caracterizar a expansão adaxial. **51.** Estípulas intrapeciolares de *Byrsonima intermedia* A.Juss. (Malpighiaceae). Na folha à esquerda, nota-se um ramo iniciando o desenvolvimento em sua axila, enquanto a gema axilar na folha à direita está protegida pela gema axilar. **52.** *Schefflera arboricola* (Hayata) Merr. (Araliaceae). Nó com estípulas intrapeciolares em base de folha de aspecto envolvente. **53.** Ápice caulinar de *Schefflera actinophylla (*Endl.) Harms (Araliaceae). Nesta espécie as estípulas intrapecíolares são mais longas. A imagem detalha uma nítida proteção do meristema apical caulinar.

50

51

52

53

A natureza são duas.
Uma, tal qual se sabe a si mesma.
Outra, a que vemos. Mas vemos?
Ou é a ilusão das coisas?

Quem sou eu para sentir
o leque de uma palmeira?
Quem sou, para ser senhor
de uma fechada, sagrada
arca de vidas autônomas?

A pretensão de ser homem
e não coisa ou caracol
esfacela-me em frente à folha
que cai, depois de viver
intensa, caladamente,
e por ordem do Prefeito
vai sumir na varredura
mas continua em outra folha
alheia a meu privilégio
de ser mais forte que as folhas.

A Folha,
Carlos Drummond de Andrade

Capítulo II

Estudo morfológico e anatômico foliar comparativo de algumas Rutaceae neotropicais: *Metrodorea* A. St.-Hil. e espécies relacionadas

Rafael Cruz, Marilia Duarte, José Rubens Pirani & Gladys Flávia A. Melo-de-Pinna

Versão em Língua Portuguesa de artigo a ser submetido para o periódico *Plant Systematics and Evolution*

Resumo

As filogenias moleculares disponíveis para Rutaceae apontam para uma necessidade de revisão de sua classificação tradicional, que deve encontrar respaldo em sinapomorfias morfológicas adequadas para os novos grupos estabelecidos. Foi realizado um estudo da morfoanatomia foliar de *Metrodorea*, gênero com distinta morfologia foliar, bem como de grupos relacionados. Secções histológicas da lâmina foliar e pecíolo, diafanizações e dissociações de epiderme foram analisadas e dados referentes às estruturas reprodutivas foram compilados da literatura, sendo apresentada uma matriz táxons e caracteres, sobre a qual foram realizadas inferências filogenéticas. *Metrodorea* tem como sinapomorfias a presença de aborto de folíolos, estípula intrapeciolar vascularizada, tricomas glandulares proximais adaxiais no pecíolo, folíolos evidentemente peciolulados, duas sementes por lóculo no fruto e estivação valvar da corola. Suas relações infragenéricas são debatidas de acordo com a localização dos cristais, forma de aderência da base das folhas e presença ou não de tricomas na lâmina foliar. A proximidade do gênero com *Raulinoa* é sustentada por uma maior quantidade de sinapomorfias morfológicas do que com outros gêneros. A monofilia de *Esenbeckia* não encontra apoio em nossos dados e *Helietta+Balfourodendron* (outrora de outra subfamília) são mais relacionados a *Esenbeckia*, *Raulinoa* e *Metrodorea* (antigas Pilocarpinae) do que com *Pilocarpus*, relação sustentada pela presença de tricomas glandulares no pecíolo, cristais prismáticos romboédricos, carpelos conatos e apófises dorsais do fruto.

Palavras-chave: venação foliar; pecíolo; Pilocarpinae; Esenbeckia alliance; Balfourodendron aliance.

Introdução

A família Rutaceae compreende 154 gêneros e cerca de 2.100 espécies, de distribuição cosmopolita, mas principalmente tropical e subtropical (Kubitzki et al. 2011). É caracterizada pela presença de cavidades secretoras nos tecidos de preenchimento do sistema caulinar e que se apresentam como pontoações ou glândulas translúcidas nas folhas (Engler 1931; Metcalfe and Chalk 1950; Kubitzki et al. 2011). Estudos filogenéticos e morfoanatômicos têm sido apontados como de interesse para o grupo, sobretudo devido à diversidade de vias metabólicas secundárias que conferem ao grupo um rico arsenal químico que pode encontrar apoio em dados evolutivos para um melhor direcionamento na sua exploração (Groppo et al. 2008).

A classificação tradicional de Rutaceae é a monografia de Engler (1931), que apresenta uma divisão em subfamílias baseada no grau de conação dos carpelos, estrutura dos frutos e características das glândulas oleíferas. Constitui o tratamento taxonômico mais abrangente já realizado sobre a família, com riqueza de detalhes dos aspectos da morfoanatomia e da distribuição geográfica. Essa classificação foi questionada na década de 80 por um estudo quimiossistemático (Silva et al. 1988) e, mais recentemente, por estudos filogenéticos (Chase et al. 1999; Poon et al. 2007; Groppo et al. 2008; Groppo et al. 2012), baseados em dados moleculares. No entanto, faz-se necessária a descoberta de novos caracteres morfológicos que sejam informativos para aprimorar trabalhos taxonômicos efetivamente condizentes com o paradigma atual da biologia evolutiva. Isto é, descobrir sinapomorfias morfológicas que sustentem novos clados reconhecidos.

Metrodorea A. St.-Hil. é um gênero neotropical com seis espécies descritas, ocorrentes principalmente em florestas úmidas e secas do Brasil, com registros no Suriname e Bolívia (Kaastra 1982; Kubitzki et al. 2011; Dias et al. 2013). Suas folhas são compostas heterofolioladas com um a três folíolos, exceto em uma espécie consistentemente unifoliolada (*M. maracasana*). A filotaxia é decussada e as bases das folhas recobrem o ápice foliar de um modo muito peculiar: uma projeção adaxial existente na base de cada folha encontra-se unida por entrelaçamento de tricomas à projeção da folha oposta a ela, formando uma estrutura em forma de capuz que protege os primórdios foliares em desenvolvimento, como relatado por Cruz et al. (in prep).

Esta estrutura da base foliar, embora frequentemente relatada na literatura como bainha (Kaastra 1977; Kaastra 1982; Kubitzki et al. 2011), é de natureza estipular (Cruz et al. in prep). Neste último trabalho, os autores relataram ainda que a condição de heterofilia observada em espécies de *Metrodorea* é resultado do aborto de folíolos em desenvolvimento, provavelmente associado à redução espacial ocasionada pela estrutura cuculada, o que pode ter levado à seleção de indivíduos que tivessem uma determinação precoce do primórdio foliar, consumindo sua porção terminal meristemática na produção de um único folíolo terminal, antes da produção de folíolos laterais.

Segundo diversos autores, *Metrodorea* está fortemente relacionada aos gêneros *Esenbeckia* Kunth, *Raulinoa* Cowan e *Pilocarpus* Vahl formando juntos a subtribo Pilocarpinae, da tribo Galipeae e subfamília Rutoideae (Engler 1931; Kaastra 1982; Pirani 1999). Esta subtribo é caracterizada por botões florais globulares, com pétalas creme ou violáceas, aproximadamente regulares e livres (Kaastra 1982). De acordo com a filogenia baseada em dados moleculares de Groppo et al. (2008), o clado formado pelos gêneros *Balfourodendron* Corr. Méllo ex Oliv. e *Helietta* Tul., tradicionalmente incluídos na subfamília Toddalioideae (Engler 1931; Pirani 1998), emerge com forte sustentação como grupo-irmão do clado formado por *Metrodorea* e *Esenbeckia*, mas sem a representação de *Raulinoa* e com o gênero *Pilocarpus* externo a todos eles. A grande semelhança floral de *Helietta* e *Esenbeckia,* pertencentes a subfamílias diferentes na classificação engleriana, foi ressaltada por Kaastra (1982) e Pirani (1998), o primeiro destes sugerindo que a separação de *Pilocarpus* dos demais gêneros de Pilocarpinae poderia ser adequada. Baseados na filogenia de Groppo et al. (2008), Kubitzki et al. (2011) definem alianças informais que associam *Metrodorea*, *Raulinoa* e *Esenbeckia* na "Esenbeckia Alliance"; *Balfourodendron* e *Helietta* na "Balfourodendron Alliance" (já transferida para a subfamília Rutoideae) e apontam *Pilocarpus* como de difícil associação com os demais gêneros.

Recentemente, Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013) elaboraram uma filogenia baseada em dados moleculares, que estabeleceu as relações entre as espécies de *Metrodorea*, bem como entre representantes de *Balfourodendron*, *Esenbeckia*, *Galipea*, *Helietta*, *Pilocarpus*, utilizando *Zanthoxylum* como grupo-externo. As relações estreitas entre as *Metrodorea* obtiveram forte suporte em todas as análises, reforçando o monofiletismo já reconhecido, devido à

morfologia tão distinta da base de suas folhas. Nesta topologia, destaca-se um clado intrigante, formado por *M. mollis* e *M. flavida*, muito distintas morfologicamente, sendo esta última espécie bem mais semelhante em diversos aspectos à *M. nigra* (Pirani 1999), o que estimula a busca por novas sinapomorfias que sustentem as relações ora propostas. Adicionalmente, *Metrodorea* desta vez parece mais relacionada com *Raulinoa*, cuja proximidade já era postulada por outros autores (Cowan 1960; Kaastra 1982) e com o clado *Bauforodendron*+*Helietta*, tornando as relações com *Esenbeckia* incertas. Além disso, as semelhanças deste último gênero com *Helietta* e *Metrodorea* e a aparente ausência de aspectos morfológicos exclusivos e claros que possam constituir sinapomorfias de *Esenbeckia*, põem em xeque seu monofiletismo.

Trabalhos anteriores já caracterizaram anatomicamente folhas dos gêneros *Pilocarpus* e *Raulinoa*, indicando uma diversidade de estruturas que podem vir a ser úteis no entendimento das relações entre os grupos (Arioli et al. 2008; Muntoreanu et al. 2011). No entanto, informações relacionadas à estrutura cuculada de *Metrodorea* (que corresponde à porção proximal do pecíolo e sua estípula intrapeciolar), bem como características anatômicas ainda não relatadas na literatura podem vir a identificar boas sinapomorfias para os clados do gênero e elucidar sua relação com os demais grupos. Neste trabalho, são apresentados dados morfoanatômicos foliares de *Metrodorea* e gêneros relacionados, segundo proposta de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013), com uma ampla discussão sobre suas implicações nas relações filogenéticas do grupo.

Material e Métodos

Para a realização deste projeto foram analisadas anatomicamente amostras de espécies da subtribo Pilocarpinae, da tribo Galipeeae. Dentre elas, quatro das seis espécies descritas de *Metrodorea* A.St.-Hil.: *M. maracasana* Kaastra, *M. mollis* Taubert, *M. nigra* A. St.-Hil. e *M. stipularis* Mart.; quatro espécies de *Esenbeckia* Kunth: *E. grandiflora* Mart., *E. irwiniana* Kaastra, *E. pilocarpoides* Kunth subsp. *pilocarpoides. Conchocarpus heterophyllus* (A. St.-Hil.) Kallunki & Pirani, da subtribo Galipeinae, tribo Galipeeae, foi utilizada como grupo-externo. O material-testemunho está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universi-

dade de São Paulo (SPF). Dados anatômicos e morfológicos sobre as espécies *M. flavida* Krause, *E. leiocarpa* Engl. e *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm. *Raulinoa echinata* Cowan, *Helietta apiculata* Benth e *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler estão disponíveis em uma série de trabalhos (Kaastra 1982; Pirani 1998; Arioli et al. 2008; Kubitzki et al. 2011; Muntoreanu et al. 2011) e são compilados aqui em uma matriz de táxon e caracteres, junto com as espécies por nós analisadas (Tabela I). Adicionalmente tivemos acesso ao material analisado por Muntoreanu et al. (2011), permitindo atualização da classificação da venação de acordo com a edição mais recente do Manual de Arquitetura Foliar (Ellis et al. 2009). *Metrodorea concinna* Pirani & P.Dias foi recentemente descrita (2013), com apoio da filogenia e aspectos biogeográficos explorados no trabalho de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013) para o gênero, mas não a tempo hábil para ser inclusa nesta análise.

Folhas do terceiro ao quinto nós de cada espécie submetida à análise anatômica foram fixadas em FAA 50 - formaldeído, ácido acético e etanol 50% - (Johansen 1940) e estocados em etanol 70%. As folhas a serem utilizadas foram selecionadas quanto a sua integridade estrutural e completa diferenciação da lâmina foliar. O material foi submetido à técnica de inclusão em parafina, seguindo metodologia descrita por Johansen (1940) com uso da série etanol/álcool butílico terciário (50-100%). As lâminas foram coradas com safranina 1% em etanol 50% e azul de astra 1% em etanol 50% (Bukatsch 1972) e, posteriormente, montadas utilizando resina sintética. Foram feitos cortes transversais e longitudinais em série. Adicionalmente secções transversais a mão livre foram obtidas com lâminas de barbear e coradas da mesma forma. Parte do material foi desidratado em série etanólica e submetidos a ponto crítico. Posteriormente, foram aderidos a suportes metálicos e cobertos com ouro, conforme o procedimento usual de MEV, descrito por Silveira (1989). As folhas passaram ainda pela técnica de dissociação de epiderme com peróxido de hidrogênio e ácido acético 1:1 (Franklin 1945) para análise da vista frontal da epiderme. Padrões de vascularização foliar foram determinados a partir de lâminas foliares diafanizadas empregando-se a técnica de Strittmater (1973). As análises anatômicas das seções foram realizadas em microscópio óptico e estereomicroscópio com as principais estruturas registradas em sistema de digitalização de imagens.

De posse da matriz produzida, uma busca exata pelo método de máxima parcimônia

(*branch and bound*), seguida de análise de consenso estrito, foi realizada com o uso do programa PAUP* (Swofford 2002). Posteriormente, com o mesmo programa, foi realizada uma análise de *bootstrap* e *jackknife*, com 10.000 replicações e 50% de corte, utilizando-se os mesmos parâmetros da busca exata, obtendo-se uma árvore de consenso de maioria das árvores obtidas em todas as replicações. As árvores obtidas foram enraizadas utilizando *Conchocarpus heterophyllus* como grupo-externo. Com o programa Mesquite (Maddison and Maddison 2011), os dados da matriz foram otimizados sobre as árvores obtidas e sobre a filogenia de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013), sendo feitas inferências sobre a evolução dos caracteres de interesse e suas modificações de estado ao longo da filogenia.

Resultados e Discussão

Morfologia da folha

1. Folhas, número de folíolos: unifolioladas precoces (0); trifolioladas precoces (1); 4 a 5-folioladas (2); folhas imparipinadas (3).
2. Folhas, filotaxia: alternas ou subopostas (0); opostas (1).
3. Folhas trifolioladas precoces, perda de folíolos durante a ontogênese: ausente (0); presente (1).
4. Folíolos, distinção macroscópica da base: sésseis a subsésseis (base sem lâmina indistinta) (0); evidentemente peciolulados (base sem lâmina distinta) (1).
5. Base da folha, estípula intrapeciolar: ausente (0); presente (1).
6. Base da folha, pecíolo alongado distalmente à estípula: ausente (0); presente (1).
7. Domácias: ausentes (0); presentes (1).
8. Constrição entre base da folha e lâmina: ausentes (0); presentes (1).
9. Intumescimento entre base da folha e lâmina: ausentes (0); presentes (1).

As folhas das espécies estudadas são oriundas de primórdios foliares que formam folíolos pareados de forma acrópeta, determinando o ápice do primórdio como folíolo terminal. No entanto, nas plantas em que esta determinação é precoce, apenas o folíolo terminal se forma,

gerando a morfologia unifoliolada precoce, de acordo com Cruz et al. (in prep). Segundo os autores, um maior período de indeterminação do primórdio gera um número de folíolos maior. Em folhas de *Metrodora flavida*, *M. mollis*, *M. nigra* e *M. stipularis*, os primórdios de folíolos podem ser abortados ou ter o desenvolvimento comprometido ao longo da ontogênese, podendo gerar folhas unifolioladas ou bifolioladas tardias (um caso de heterofilia). A distinção usual entre folhas simples e unifolioladas era baseada na presença de articulação entre porções de lâmina foliar e pecíolo, por intumescimento ou constrições, que surgem após a formação dos primórdios de folíolos, não tendo relação, portanto, com a distinção entre folhas simples e compostas, como esclarecido por Cruz et al. (in prep). A folha unifoliolada, é tratada aqui, portanto, como idêntica a uma folha simples quanto ao desenvolvimento, porém com ancestralidade composta. *Esenbeckia leiocarpa*, sempre tratada como possuidora de folhas simples, tem base da lâmina atenuada abaixo do intumescimento, que é semelhante ao de *E. grandiflora*. Neste caso, ela é aqui tratada como não peciolulada. Todas as demais folhas com folíolos sésseis têm lâminas que se atenuam até a constrição ou intumescimento. Ainda segundo Cruz et al. (in prep), a projeção adaxial em *Metrodorea* deve ser tratada como estípula intrapeciolar, que está associada a um pecíolo alongado distalmente em todas as espécies exceto *M. stipularis,* destituída de pecíolo alongado. Constrições entre base e lâmina foliar podem ser encontradas em todas as folhas de *Metrodorea*, em *Balfourodendron riedelianum* e em *Helietta apiculata*. Intumescimentos foram observados em todas as espécies de *Esenbeckia*, exceto em *E. irwiniana*.

Anatomia da base da folha

10. Pecíolo, contorno das células epidérmicas: poligonal (0); papilosa (1).
11. Pecíolo, tricomas tectores: ausentes (0); presentes (1).
12. Pecíolo, longos tricomas tectores concentrados adaxial-proximalmente: ausentes (0); presentes (1).
13. Pecíolo, tricomas glandulares: ausentes (0); presentes (1).
14. Pecíolo, tricomas glandulares concentrados adaxial-proximalmente: ausentes (0); presentes (1).
15. Pecíolo, cavidades secretoras: ausentes (0); presentes (1).

16. Pecíolo, tipo de cristais presentes: cristais prismáticos (0); drusas (1); ráfides (2).
17. Pecíolo, fibras perivasculares: ausentes (0); presentes (1).
18. Base da folha, feixes adaxiais vascularizando estípula intrapeciolar: ausentes (0); presentes (1).
19. Estrutura cuculada (estípulas intrapeciolares unidas), margens: glabras (0); coerentes por denteação (1).

Na maioria das espécies encontradas, a nervura central dos folíolos é representada por feixes vasculares muito próximos, com regiões interfasciculares muito curtas (cerca de uma a duas células ou agregados), correspondente ao padrão mais comumente encontrado em Rutaceae (Metcalfe and Chalk 1950). Fibras perivasculares são ausentes ao redor da nervura de *Metrodorea mollis*, *Esenbeckia leiocarpa*, *Helietta apiculata* e *Balfourodendron riedelianum*, mas presentes nas demais espécies, formando um cilindro interrompido (Figs. 1-2). Ao longo do sentido distal-proximal, o sistema vascular subdivide-se em três arcos vasculares contínuos com os três traços (Fig. 3) que se agregam ao sistema vascular do caule na região nodal, do tipo trilacunar 3-traços, condizente com o tipo relatado na literatura para o grupo (Kaastra 1977; Kubitzki et al. 2011). Excepcionalmente o pecíolo de *M. stipularis*, seccionado do ápice à base, tem seus três arcos vasculares contínuos com as nervuras centrais dos folíolos, sem união entre eles em um sistema vascular único. Em *Metrodorea*, a porção proximal e adaxial do pecíolo possui uma região com longos tricomas multicelulares entremeados, que promovem a aderência entre a base das folhas jovens, promovendo proteção da gema apical (Cruz et al. in prep; Kaastra 1982), condição também observada em *Raulinoa* (Cruz et al. in prep).

Quanto ao sistema de revestimento da base da folha, a maioria das espécies analisadas apresenta iniciação de felogênio subepidérmica (Figs. 1-2). Em algumas regiões, são observadas lenticelas (Fig. 2), característica já descrita para o caule de outras Rutaceae (Metcalfe and Chalk 1950). A única exceção é *Metrodorea mollis*, a qual apresenta sistema primário de revestimento constituído por células papilosas, como em *Esenbeckia leiocarpa* (Muntoreanu et al. 2011), e tricomas tectores (Figs. 3-4). Optamos por não utilizar características referentes ao sistema secundário de revestimento, uma vez que a iniciação do felogênio parece muito variá-

vel ao longo do mesmo indivíduo. Cristais foram encontrados no pecíolo de todas as espécies, sendo sua ocorrência, bem como seus tipos, congruentes com os tipos presentes na lâmina foliar. Feixes vasculares na estípula intrapeciolar são presentes em todas as espécies de *Metrodorea*, exceto em *M. nigra* (Cruz et al. in prep). O mesmo trabalho relata que a aderência entre as margens da estrutura cuculada é resultado de denteação das células epidérmicas adjacentes em *M. mollis* (Fig.4) e *M. flavida*, e que nas demais espécies do gênero, as margens são glabras (Fig. 5). Em *Metrodorea*, além dos longos tricomas entremeantes na região adaxial e proximal do pecíolo, tricomas glandulares capitados também são presentes, em região mais proximal do pecíolo (Fig. 5).

Lâmina foliar, sistema de revestimento

20. Tricomas tectores unisseriados: ausentes (0); presentes (1).
21. Tricomas tectores unisseriados, número de células: unicelular (0); multicelular (1).
22. Tricomas glandulares: ausentes (0); presentes (1).
23. Tricomas glandulares, tipo: capitados (0); peltados (1).
24. Contorno das paredes anticlinais das células da epiderme em vista frontal: retas (0); sinuosas (1).
25. Estômatos, localização: somente face abaxial (0); ambas as faces, mas raros na face adaxial (1).

Na lâmina foliar, tricomas tectores são ausentes em *Esenbeckia pilocarpoides* e em espécies de *Metrodorea*, com exceção de *M. mollis* (Fig. 6). Em *E. irwiniana*, os tricomas tectores são mais densamente distribuídos na face abaxial (Fig. 7). Nas espécies onde ocorrem, são unicelulares, exceto em *Conchocarpus heterophyllus* (Fig. 8), onde são multicelulares. Tricomas não ocorrem na lâmina foliar de *Raulinoa echinata* segundo Arioli et al. (2008) e Muntoreanu et al. (2011). Metcalfe & Chalk (1950) afirmam que tricomas não são frequentes em muitos membros da família e Kaastra (1982) menciona que pode ocorrer variação quanto à sua presença na mesma espécie.

Tricomas glandulares são presentes em todas as espécies, exceto em *Esenbeckia grandiflora*, sendo capitados com uma cabeça multicelular pedunculada em *Conchocarpus hetero-*

phyllus, E. irwiniana e em *E. pilocarpoides* (Figs. 9-11) e peltados em *Metrodorea* (Fig. 12). Tricomas glandulares foram encontrados em todas as espécies analisadas por Muntoreanu et al. (2011), sendo capitados na maioria das espécies, mas peltados em *M. flavida*, *Raulinoa echinata* e *Helietta apiculatta*.

Em *Conchocarpus heterophyllus*, *Esenbeckia irwiniana* e *E. grandiflora*, as paredes anticlinais das células epidérmicas, em vista frontal, são retas em ambas as faces (Fig. 13). Em *Metrodorea* as paredes anticlinais da epiderme, em vista frontal, são sinuosas (Figs. 14-17), assim como em *E. pilocarpoides*. No entanto, em *Metrodorea stipularis* (Figs. 14, 17) e em *E. pilocarpoides* a sinuosidade é mais discreta que nas demais espécies.

Estômatos na face adaxial são relatados apenas em *Esenbeckia irwiniana*, condição presente em algumas espécies de *Ruta*, *Zanthoxylum*, *Acmadenia*, *Coleonema* e *Cneoridium* (Metcalfe and Chalk 1950; Kubitzki et al. 2011), ocorrendo também na face abaxial. As demais espécies são hipoestomáticas, condição mais frequente na família (Metcalfe and Chalk 1950; Kubitzki et al. 2011; Muntoreanu et al. 2011). Em todas as espécies analisadas foram observados estômatos anomocíticos (Figs. 13-15). Embora Muntoreanu et al. (2011) tenham classificado os estômatos como tetracíticos e ciclocíticos, suas imagens revelam que as células subsidiárias não parecem ter tamanhos e formas regulares o bastante para serem descritas nesses padrões e todas as espécies analisadas devem ser classificadas com o padrão anomocítico (Radford et al. 1974), o que está de acordo com o observado em *Raulinoa* por Arioli et al. (2008).

Lâmina foliar, mesofilo e região da nervura central

26. Parênquima paliçádico, número de camadas: uma (0); mais de uma (1).
27. Cavidades secretoras: ausentes (0); presentes (1).
28. Cristais concentrados na camada subepidérmica da nervura central: ausentes (0); presentes (1).
29. Cristais em compartimentos no parênquima paliçádico: ausentes (0); presentes (1).
30. Lâmina foliar, extensão da bainha do feixe: ausente (0); presente (1).
31. Nervura central, arco medular: ausente (0); presente (1).

Todas as espécies analisadas anatomicamente possuem apenas uma camada de parên-

quima paliçádico, associada a células coletoras que formam uma camada contínua (Fig. 18) ou não (Fig. 19-20), mas que faz a interface com o parênquima lacunoso, composto por células braciformes frouxamente dispostas (Figs. 19-20), semelhante ao padrão encontrado em todas as espécies analisadas por Muntoreanu et al. (2011), exceto *Helietta apiculata*, que apresenta duas a três camadas de parênquima paliçádico. Os feixes vasculares na lâmina são colaterais, com floema voltado para a superfície abaxial, envoltos por uma bainha parenquimática (Figs. 20-21), com exceção de *Esenbeckia irwiniana*, na qual há extensão da bainha até as camadas subjacentes às faces da epiderme (Fig. 22).

O sistema vascular da nervura mediana é formado por dois arcos de feixes muito próximos (uma célula de distância ou agregados, Fig. 23), um na região adaxial e um na região abaxial, ambas com as porções de xilema voltadas para dentro (Fig. 24). Os dois arcos são unidos pelas pontas, ainda que somente por porções do periciclo, formando um cilindro (Figs. 6, 24). Esta união é menos acentuada, em algumas regiões, devido às nervuras secundárias que são contínuas com porções de ambos os arcos.

Uma medula parenquimática preenche o interior do cilindro vascular na nervura mediana. Em *Esenbeckia irwiniana* um terceiro arco vascular é observado nesta região (Fig. 25), uma condição descrita por Radford (1974) em pecíolos como placa medular, embora o termo arco seja mais apropriado. Quanto ao contorno da nervura central, em seção transversal, todas as espécies observadas possuem a região abaxial convexa (Figs. 6, 24). Já a face adaxial é plana a variavelmente côncava ou convexa em *Metrodorea stipularis* e *M. maracasana*. Em *Conchocarpus heterophyllus*, *E. grandiflora* e *E. irwiniana* a face adaxial é evidentemente côncava. As nervuras centrais de folhas de *E. pilocarpoides* e demais espécies de *Metrodorea* são biconvexas. No entanto, Muntoreanu (2008) sugere a não utilização deste caráter, pois além de difícil delimitação de estados, apresenta variação na mesma espécie.

Cavidades secretoras estão presentes no mesofilo e região da nervura central (Figs. 6, 24, 26), com células epiteliais secretoras (Fig. 26). Correspondendo a uma das mais reconhecidas características de Rutaceae, cavidades secretoras são interpretadas como esquizógenas ou lisígenas na família (Metcalfe and Chalk 1950; Kaastra 1982). No entanto, a lise de células, frequentemente, é apenas um artefato de técnicas de fixação do material (Turner et al. 1998).

Cristais presentes na região da nervura central e mesofilo, inclusive nos tecidos vasculares, com variação quanto ao tipo, sendo ráfides em *Esenbeckia pilocarpoides* (Fig. 27), drusas em *Conchocarpus heterophyllus* (Fig. 18) e cristais prismáticos romboédricos, tanto cúbicos como em forma de bastões (Fig. 28), tipos já relatados para a literatura de Rutaceae (Metcalfe and Chalk 1950). No parênquima paliçádico, esses cristais são encontrados em compartimentos formados por paredes transversais ao maior comprimento da célula, como já registrado para *Pilocarpus* (Metcalfe and Chalk 1950; Muntoreanu et al. 2011). No entanto, em *E. pilocarpoides* e *Metrodorea mollis*, os cristais são pouco frequentes em todos os tecidos e não foram encontradas no parênquima paliçádico. Em *M. nigra*, *M. maracasana* e *M. flavida*, foram encontrados cristais concentrados na camada subepidérmica da região da nervura central (Fig. 29), condição inédita na literatura.

Venação

32. Venação, conexão de nervuras secundárias maiores com a nervura central: totalmente decurrente (0); somente basais decurrentes (1); totalmente excurrente (2).
33. Venação, nervuras intersecundárias: ausentes (0); presentes (1).
34. Venação, categoria das nervuras quaternárias: livremente ramificadas (0); reticuladas irregulares (1).
35. Venação, desenvolvimento das aréolas: pouco desenvolvidas (0); bem desenvolvidas (1).
36. Venação, categoria da venação última terminal: incompleta (0); em arcos (1).

A venação de todas as espécies observadas é, caracteristicamente, pinada e broquidódroma simples (Fig. 30), como já relatado em espécies fósseis de Rutaceae do Oligoceno tardio (Pan 2010) e também citado por Muntoreanu et al. (2011). As conexões de nervuras secundárias com a central são totalmente excurrentes em *Balfourodendron riedelianum* e *Esenbeckia grandiflora* (Fig. 31); decurrentes apenas na região basal da folha em *Raulinoa echinata*, *M. mollis* (Fig. 30), *M. nigra* e *M. stipularis* e totalmente decurrentes nas demais espécies (Fig. 32). Nervuras intersecundárias são ausentes apenas em *E. leiocarpa*. As nervuras terciárias são todas percurrentes mistas (Fig. 33). Nervuras quaternárias são reticuladas irregulares em *E. irwiniana*

e *E. pilocarpoides* (Fig. 34) e livremente ramificadas nas demais espécies (Fig. 35). Todas as espécies apresentam terminações das nervuras ramificadas (Figs. 34-36) e areolação (Figs. 36-38). As aréolas são pouco desenvolvidas (maioria das aréolas de tamanhos e formas irregulares com mais de sete lados) em *B. riedelianum*, *Helietta apiculata* (Fig. 36), *R. echinata* e *Pilocarpus microphyllus*, mas bem desenvolvidas (maioria das aréolas de tamanhos regulares com três a seis lados) nas demais espécies (Figs. 37-38). A venação última terminal é incompleta em *B. riedelianum*, *E. grandiflora* (Fig. 39), *E. leiocarpa*, *H. apiculatta* e em *P. microphyllus*, sendo em arcos nas demais espécies (Fig. 40).

Estruturas reprodutivas

37. Flor, número básico: tetrâmeras (0); pentâmeras (1).

38. Corola, cor: alva a creme (0); rubra a purpúrea (1).

39. Corola, prefloração: imbricativa (0); valvar (1).

40. Carpelos, união: completamente conatos (0); parcialmente conatos (1); livres (2).

41. Frutos, ornamentação: liso (0); muricado (1); equinado (2).

42. Frutos, apófises dorsais: ausentes (0); presentes (1).

43. Frutos, estruturas aladas: ausentes (0); presentes (1).

44. Sementes, quantidade por lóculo: uma (0); duas (1).

45. Sementes, poliembrionia: ausente (0); presente (1).

Uma série de caracteres reprodutivos dos gêneros aqui estudados é relatada na literatura (Kaastra 1982; Pirani 1998; Pirani 1999; Pombal and Morellato 2000; Kubitzki et al. 2011). Quanto ao tipo de inflorescência, embora a literatura consistentemente apresente racemos para *Pilocarpus*, os termos tirso e panícula se confundem entre os autores, o que pode ser melhor compreendido pelo trabalho de Endress (2010), que registra sua difícil delimitação. Portanto, o tipo de inflorescência não foi aqui tratado, mas registramos a necessidade de trabalhos que reavaliem adequadamente suas variações no grupo. Flores são tetrâmeras em *Balfourodendron riedelianum* e em *Raulinoa echinata* e pentâmeras nas demais espécies. Quanto à corola, flores rubras a purpúreas ocorrem em *R. echinata* e *Metrodorea nigra*, sendo alvas a creme nas demais espécies. A prefloração da corola também é relatada com detalhes na literatura, sendo que

a única delimitação possível, no âmbito do presente trabalho, é a condição valvar presente em *Metrodorea* e variações da prefloração imbricativa nas demais espécies. Conação completa dos carpelos ocorre em quase todas as espécies, exceto em *Pilocarpus mycrophyllus* e *Esenbeckia pilocarpoides*, onde são unidos apenas pela base, e em *Conchocarpus heterophyllus*, onde são unidos apenas no centro-axial e na base (Kaastra 1982; El Ottra et al. 2013). A ornamentação dos frutos também parece prover rica informação nesse grupo e é frequentemente encontrada na literatura descritiva, destacando-se a presença de apófises dorsais e expansões aladas. Trabalhos de anatomia dos frutos dos gêneros em foco são raros e também necessários para esclarecer a verdadeira natureza das projeções do pericarpo, indicando possíveis homologias e homoplasias. Todas as espécies são relatadas como biovuladas, no entanto podem diferir quanto ao número de sementes presentes por lóculo do fruto, de acordo com a literatura. Para *M. nigra*, embora a variação seja relatada, plantas com duas sementes por lóculo são mais frequentes (Souza et al. 2008). Poliembrionia é relatada para *E. grandiflora* e *E. pilocarpoides* (Kaastra 1982).

Tabela I. Matriz de táxons e caracteres, com respectivos estados. A codificação é apresentada ao longo dos resultados deste trabalho. "?" indica uma condição desconhecida e "-" a não aplicabilidade do caráter.

Espécie	Caracteres e seus estados								
	1	11111	11112	22222	22223	33333	33334	44444	
	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345
Balfourodendron riedelianum	11010	-1100	100-1	00--1	01000	01?10	02100	00000	01100
Conchocarpus heterophyllus	20-10	-0000	100-1	11--1	11000	01010	00101	11001	00000
Esenbeckia grandiflora	00-00	-0010	10101	01--1	00-00	01010	02101	01000	200?1
Esenbeckia irwiniana	10010	-0000	10101	01--1	01101	01011	10111	11000	110?0
Esenbeckia leiocarpa	00-00	-0011	10100	00--1	01000	00?10	00001	01000	01010
Esenbeckia pilocarpoides	10000	-0010	10101	21--0	-1110	01000	00111	11001	11001
Helietta apiculata	11000	-0101	10101	00--1	01100	11?10	00100	01000	01100
Metrodorea flavida	11111	10100	11111	01110	-1110	01110	00101	11010	11010
Metrodorea maracasana	01-11	10100	01111	01100	-1110	01110	00101	11010	110?0
Metrodorea mollis	11101	10101	11111	00111	01110	01000	01101	11010	100?0
Metrodorea nigra	11111	10100	11111	01000	-1110	01110	01101	11110	11010
Metrodorea stipularis	11111	00100	11111	01100	-1110	01010	01101	11010	11010
Pilocarpus microphyllus	30-00	-0100	100-1	11--1	01000	01?10	00100	01001	00000
Raulinoa echinata	01-00	-0000	110-1	01--1	01100	01010	01100	10100	01000

A busca exata, com 32 caracteres informativos (sendo na matriz os demais variáveis não informativos) e enraizamento em *Conchocarpus heterophyllus*, resgatou sete árvores igual-

mente parcimoniosas. Em nenhuma delas *Esenbeckia* emergiu como grupo monofilético (Fig. 41), já que as quatro espécies analisadas do gênero emergiram em dois a três clados distintos. A árvore de consenso estrito (Fig. 42) revela todas as espécies de *Metrodorea* formando um grupo monofilético. *M. flavida* é apontada como grupo-irmão de *M. maracasana,* relação sustentada pelas nervuras secundárias totalmente decurrentes (decurrentes somente na base nas demais espécies do gênero e em *Raulinoa echinata*). O clado *M. flavida*+*M. maracasana* emerge como grupo-irmão de *M. nigra*, unidos pelos cristais prismáticos concentrados na camada subepidérmica da região da nervura central. *M. mollis* surge na base do gênero, devido à presença de tricomas tectores na lâmina foliar, característica presente na maior parte das espécies, mas ausente nas demais espécies de *Metrodorea*. *M. mollis* é a única espécie que destoa das relações infragenéricas inferidas com dados moleculares por Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013). A estreita relação entre *Esenbeckia irwiniana* e *E. pilocarpoides* (Fig. 42) é sustentada pelas nervuras quaternárias reticuladas irregulares. *Metrodorea* surge como grupo-irmão de *R. echinata* como clado bem sustentado. No entanto, a análise não permitiu gerar hipóteses sobre as relações entre *Raulinoa*+*Metrodorea*, *Helietta* +*Balforodendron* e as espécies de *Esenbeckia,* uma vez que estes grupos apresentam-se numa politomia. Todos estes grupos são mais relacionados entre si do que com *Pilocarpus*, hipótese sustentada pela presença de tricomas glandulares no pecíolo, cristais prismáticos romboédricos (ausentes em *E. pilocarpoides*), carpelos completamente conatos e apófises dorsais do fruto (ausentes em *E. grandiflora*). Este resultado aponta um parentesco maior entre duas alianças informais definidas por Kubitzki et al. (2011) "Balfourodendron Alliance" e "Esenbeckia Alliance", levantando novas questões quanto à delimitação de Pilocarpinae.

Aceitando-se o valor mínimo de 50% para o suporte dos ramos após a análise de *bootstrap*, a topologia obtida é semelhante ao consenso estrito, exceto pela posição de *Raulinoa echinata* e *Esenbeckia irwiniana*+*Esenbeckia pilocarpoides*, que colapsam junto à politomia formada por *Metrodorea*, *Helietta*+*Balfourodendron* e as demais espécies de *Esenbeckia* (Fig. 43). Ainda que pouco resolvido, o resultado não contradiz nenhuma das relações de gênero da árvore de consenso de maioria da análise *bootstrap* pelo método de máxima parcimônia realizado com dados moleculares de *Metrodorea* e espécies relacionadas (Dias et al. submetido apud

Dias et al. 2013). No entanto, *M. mollis* aparece como grupo-irmão de um clado com as demais espécies do gênero, destoando das relações encontradas naquele estudo molecular.

Considerando que as análises de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013) apresentaram um bom suporte para as relações entre espécies de *Metrodorea*, optou-se por buscar sinapomorfias que sustentem os clados otimizando nossos dados pelo método de máxima parcimônia, expressas explicitamente na Fig. 44. Nesse enfoque, o gênero é sustentado pela presença de aborto de folíolos (sofrendo reversão em *M. maracasana*), estípula intrapeciolar vascularizada (com perda da vascularização em *M. nigra*), tricomas glandulares na região adaxial e proximal do pecíolo, duas sementes por lóculo no fruto (embora esta informação esteja disponível apenas para três espécies) e prefloração valvar da corola. No clado *Metrodorea,* a posição basal é ocupada por *M. stipularis*. Neste contexto é notável que as paredes anticlinais da epiderme desta espécie sejam menos sinuosas que as das demais espécies do gênero, mas não retas como na maioria das outras espécies analisadas. O ancestral de *Metrodorea* poderia ter iniciado um estágio de sinuosidade pouco acentuada, enquanto o ancestral do grupo-irmão de *M. stipularis* teria experimentado acentuação desse caráter. No entanto, é difícil postular paredes sinuosas como uma sinapomorfia do gênero, uma vez que não é refutada a hipótese de *Esenbeckia pilocarpoides* ser grupo-irmão de *Metrodorea*.

O clado-irmão de *Metrodorea stipularis* é sustentado pela presença de cristais concentrados na hipoderme. Esta última característica não é observada em *M. mollis*, o que pode ser devido a uma reversão do estado de caráter ou pelo simples fato de cristais serem mais raros nesta espécie. Dentro deste clado, *M. nigra* emerge como grupo-irmão das outras três espécies. No entanto, não identificamos, por meio dos nossos dados, sinapomorfias que sustentem esta relação. Finalmente, a topologia baseada em dados moleculares mostra *M. flavida* e *M. mollis* como o par de espécies mais proximamente relacionadas, e tal hipótese pode ser agora corroborada pela evidência de que ambas não possuem as margens da estrutura cuculada glabras, mas sim dotadas de tricomas entremeantes curtos e células papilosas que são aderentes por denteação. Desse modo, os tricomas da lâmina foliar de *M. mollis* representariam uma autapomorfia e não uma plesiomorfia como consta na topologia obtida com os dados morfológicos.

No trabalho de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013), houve divergências quan-

to à relação de *Raulinoa* com *Helietta+Balfourodendron* e com *Metrodorea*. Partindo de uma politomia contendo estes três grupos, apresentamos três possibilidades de solução (Fig. 45). O clado *Raulinoa+Metrodorea* seria sustentado pela presença dos longos tricomas que unem a base das folhas por entrelaçamento, ausência de tricomas tectores na lâmina foliar (condição revertida em *M. mollis*), nervuras decurrentes somente na base da lâmina foliar (com reversão em *M. flavida* e *M. maracasana*) e venação última terminal em arcos. A segunda possibilidade seria *Helietta+Balfourodendron* emergindo como grupo-irmão de *Metrodorea*, relação sustentada pelas constrições entre a base da folha e lâmina. A terceira possibilidade, *Raulinoa* como grupo-irmão de *Helietta+Balfourodendron*, teria como sinapomorfia a presença de aréolas pouco desenvolvidas. Aceitar uma das possibilidades implica tornar ambíguos os estados de caráter sinapomórficos das outras possibilidades. A primeira possibilidade, portanto, minimiza as homoplasias necessárias para explicar esta relação.

A pequena quantidade de caracteres informativos, bem como um grande número de incongruências entre eles, levou à ineficiência na reconstrução de uma única árvore robusta com os caracteres observados, bem como em obter bom suporte da maioria das relações entre as espécies estudadas. No entanto, a filogenia realizada com dados moleculares apresentada por Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013) permitiu algumas conjecturas bem embasadas sobre a evolução de alguns aspectos da anatomia neste grupo. A proximidade de *Metrodorea* com *Raulinoa*, já postulada por outros autores (Cowan 1960; Kaastra 1982) é reforçada aqui, por uma série de sinapomorfias. No entanto, reforçamos que a relação da estrutura cuculada de *Metrodorea* (estípulas e porção proximal do pecíolo) com os espinhos de *Raulinoa* (ramos modificados), postulada por Cowan (1960) não é um indicativo adequado para a proximidade dos gêneros, como já apontado por Kaastra (1982). Enfatizamos a necessidade de incluir mais representantes do gênero *Esenbeckia* em reconstruções filogenéticas, para averiguar se é um grupo monofilético e guiar futuros tratamentos taxonômicos relativos ao gênero. Adicionalmente, uma descrição inédita da anatomia foliar das espécies de *Metrodorea*, de quatro espécies de *Esenbeckia* e de *Conchocarpus heterophyllus* foi apresentada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP e à CAPES pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

Referências

Arioli T, Voltolini CH, Santos M (2008) Morfoanatomia foliar da reófita *Raulinoa echinata* R.S. Cowan – Rutaceae. Acta Botanica Brasilica 22:723–732.

Bukatsch F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. Mikrokosmos 61:255.

Chase MW, Morton CM, Kallunki JA (1999) Phylogenetic relationships of Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies using evidence from RBC and ATP sequence variation. American Journal of Botany 86:1191–1199.

Cowan RS (1960) Rutaceae of Santa Catarina. Sellowia - Anais Botânicos do Herbario Barbosa Rodrigues 12:79–105.

Cruz R, Duarte MBH, Pirani JR, Melo-de-Pinna GF Redução do número de folíolos a partir de um ancestral com folhas compostas: morfogênese foliar em *Metrodorea* A. St.-Hill, um gênero neotropical de Rutaceae com bases de folhas protetoras, e espécies relacionadas.

Dias P, Udulutsch RG, Kallunki JA, Pirani JR (submetido) Molecular phylogeny and biogeography of *Metrodorea* (Rutaceae): biogeographic implications for South America. BMC Evolutionary Biology.

Dias P, Udulutsch RG, Pirani JR (2013) A new species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil: morphology, molecular phylogenetics, and distribution. Phytotaxa 117:35–41.

Ellis B, Daly DC, Hickey LJ, Johnson KR, Mitchell JD, Wilf P, Wing SL (2009) Manual of leaf architecture. Cornell University Press, New York.

Endress PK (2010) Disentangling confusions in inflorescence morphology: patterns and diversity of reproductive shoot ramification in angiosperms. Journal of Systematics and Evolution 48:225–239.

Engler A (1931) Rutaceae. Engler, A; Prantl, K. (eds.) Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Velag Von

Wiilhelm Engelmann, Leipizig, pp 187–359.

Franklin G (1945) Preparation of thin sections of synthetic resins and wood - resin composites and a new macerating method for wood. Nature 155:51.

Groppo M, Kallunki JA, Pirani JR, Antonelli A (2012) Chilean *Pitavia* more closely related to Oceania and Old World Rutaceae than to Neotropical groups: evidence from two cpDNA non-coding regions, with a new subfamilial classification of the family. PhytoKeys 19:9–29.

Groppo M, Pirani JR, Salatino MLF, Blanco SR, Kallunki JA (2008) Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. American Journal of Botany 95:985–1005.

Johansen DA (1940) Plant microtechinique. McGraw - Hill Book Co. Inc., New York.

Kaastra RC (1982) Pilocarpinae (Rutaceae). Flora Neotropica 33:1–197.

Kaastra RC (1977) Leaf sheaths and obturators in Rutaceae - Pilocarpinae. Beitrage zur Biologie der Pflanzen 53:317–320.

Kubitzki K, Kallunki JA, Duretto M, Wilson PW (2011) Rutaceae. In: Kubitzki K (ed) - The families and genera of vascular plant Vol. 10: Flowering Plants. Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer, Berlin, pp 276–356.

Maddison WP, Maddison DR (2010) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 http://mesquiteproject.org

Metcalfe CR, Chalk L (1950) Rutaceae. In: Anatomy of the Dicotyledons Vol. 1. Clarendon Press, Oxford, pp 305-316.

Muntoreanu TG (2008) Descrição e mapeamento de caracteres morfoanatômicos foliares em *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) e gêneros relacionados. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Muntoreanu TG, Cruz R da S, Melo-de-Pinna GF (2011) Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical Rutaceae: *Pilocarpus* Vahl and related genera. Plant Systematics and Evolution 296:87–99.

Pan AD (2010) Rutaceae leaf fossils from the Late Oligocene (27.23 Ma) Guang River flora of northwestern Ethiopia. Review of Palaeobotany and Palynology 159:188–194.

Pirani JR (1999) Estudos taxonômicos em Rutaceae: revisão de *Helietta* e *Balfourodendron* (Pteleinae), análise cladística de Pteleinae, sinopse de Rutaceae no Brasil. Tese de Livre Docência.

Universidade de São Paulo, São Paulo.

Pirani JR (1998) A revision of *Helietta* and *Balfourodendron* (Rutaceae-Pteleinae). Brittonia 50:348–380.

Pombal ECP, Morellato LPC (2000) Differentiation of floral color and odor in two fly pollinated species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil. Plant Systematics and Evolution 221:141–156.

Poon W, Shaw P, Simmons M, But P (2007) Congruence of molecular, morphological, and biochemical profiles in Rutaceae: a cladistic analysis of the subfamilies Rutoideae and Toddalioideae. Systematic Botany 32:837–846.

Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR (1974) Vascular plant systematics. Harper and Row, New York.

Silva MF das GF, Gottlieb OR, Ehrendorfer F (1988) Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. Plant Systematics and Evolution 161:97–134.

Silveira M (1989) Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica. Universidade de São Paulo, São Paulo, pp 71–79.

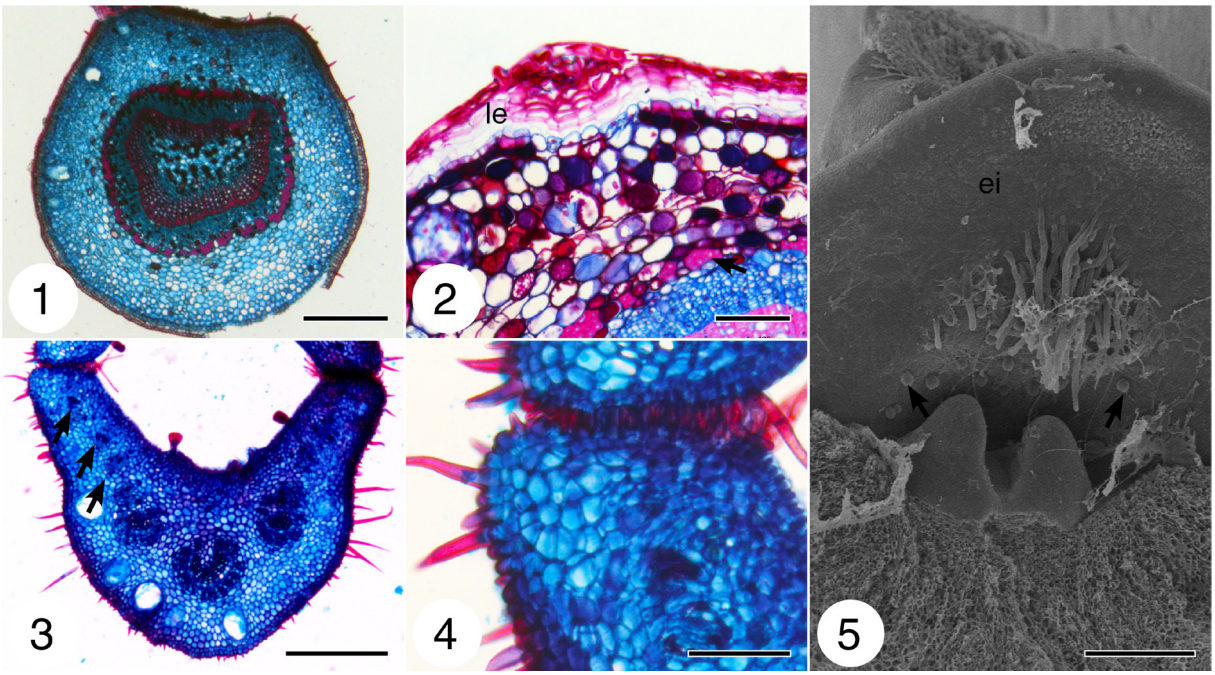
Souza LA De, da Rosa SM, Moscheta IS (2008) Anatomy of the Developing Fruit of *Metrodorea nigra* A.St.- Hil. (Rutaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology 51:1171–1179.

Strittmater CGD (1973) Nueva técnica de diafanización. Boletín de la Sociedad Argentina de Botanica, Buenos Aires 15:126–129.

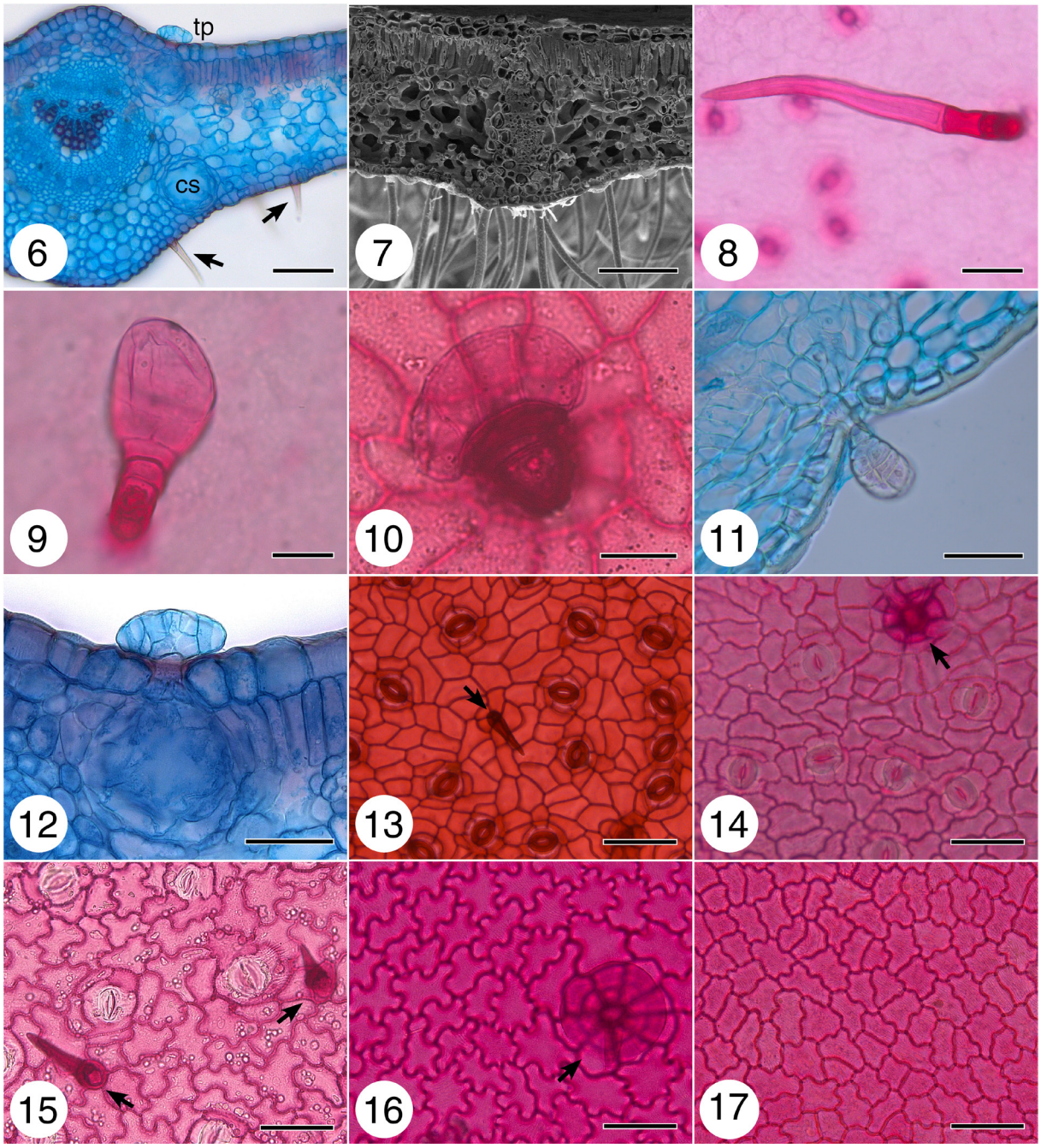
Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Turner GW, Berry AM, Gifford EM (1998) Schizognous secretory cavities of *Citrus limon* (L.) Burm. f. and a reevaluation of the lysigenous gland concept. International Journal of Plant Sciences 151:75–88.

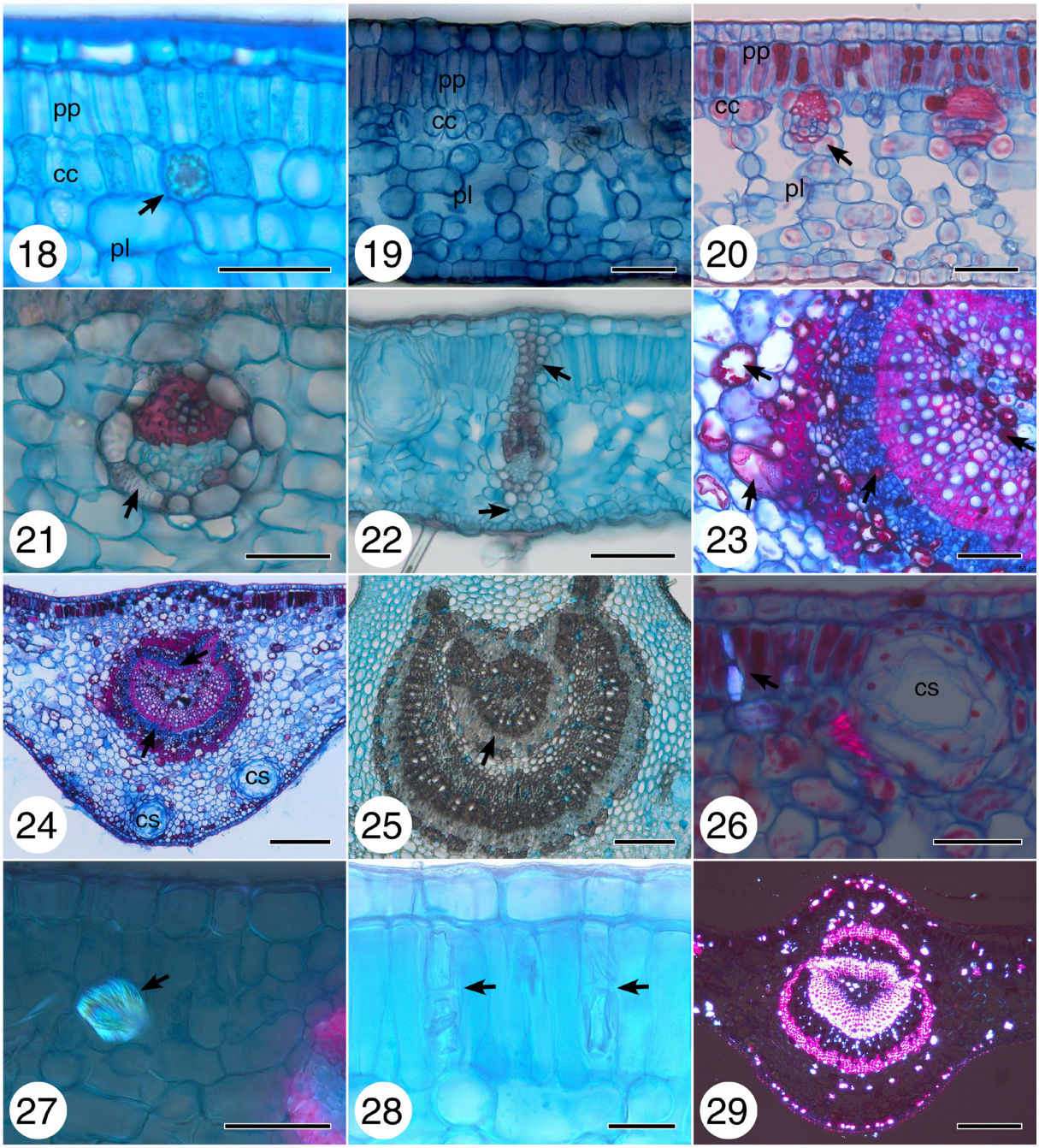
Figuras 1-5. Bases de folhas. **1-4.** Secções transversais do pecíolo. **1.** *Metrodorea nigra*. Porção distal do pecíolo, com cilindro vascular fechado, circundado por fibras perivasculres. Sistema de revestimento, em alguns pontos, formado pela periderme. **2.** *Esenbeckia grandiflora*. Lenticela (le) e um conjunto de fibras perivasculares (seta). **3-4.** *Metrodorea mollis*. Porção proximal do pecíolo **3.** Além das três unidades vasculares, feixes associados à estípula intrapeciolar são indicados por seta. **4.** Em maior aumento, é possível observar a epiderme papilosa, com tricomas auxiliando a adesão das margens da estrutura cuculada. **5.** Microscopia eletrônica de varredura da porção interna da estrutura cuculada de *M. maracasana*. Além de longos tricomas tectores que entrelaçados promovem a adesão da estrutura cuculada, formada pela porção proximal do pecíolo e estípula intrapeciolar (ei), tricomas glandulares são visíveis nesta região (setas). **Barras:** 1,3=400µm; 2,4=100µm; 5=200µm.


1
le
2
ei
3
4
5

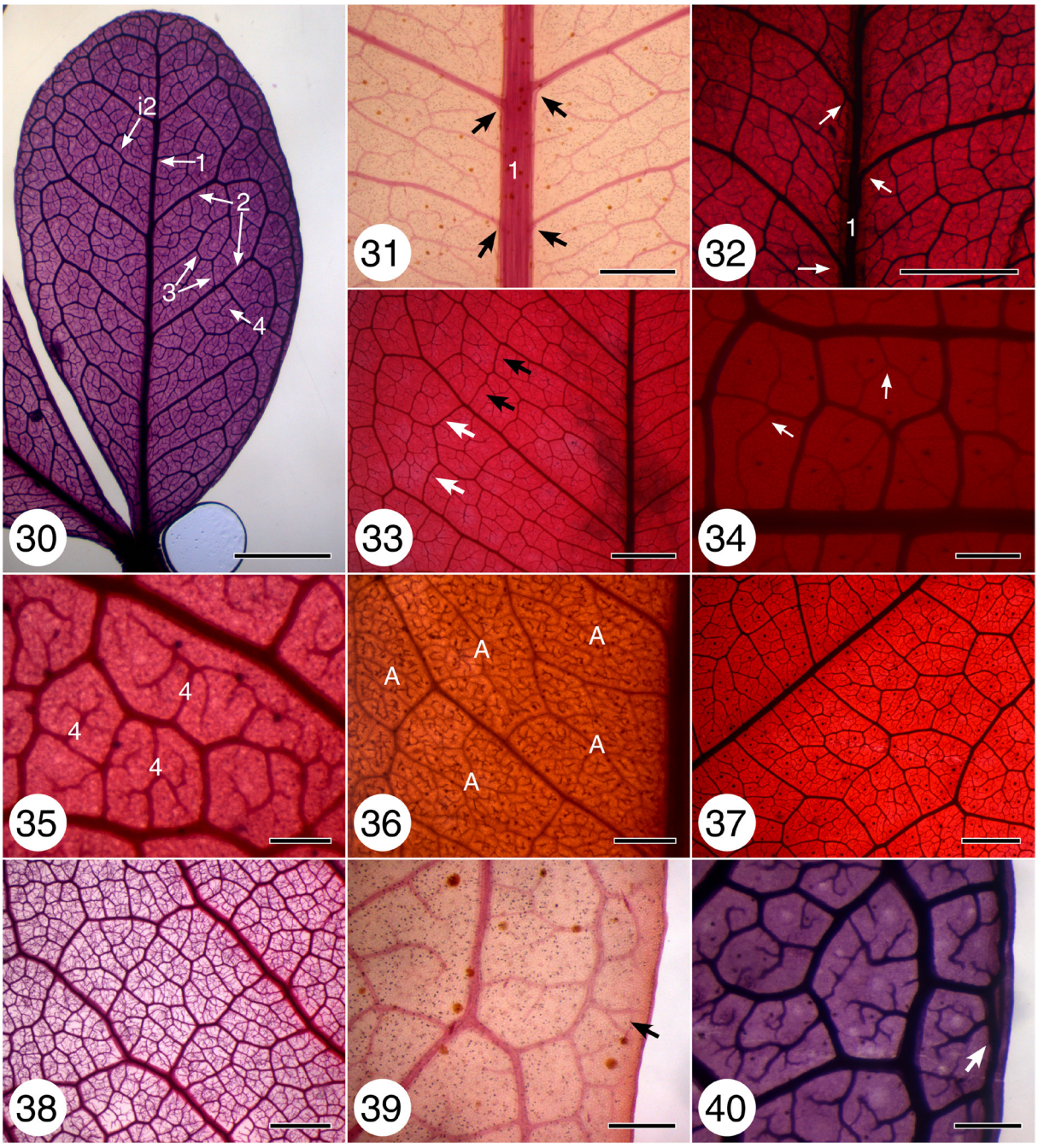
Figuras 6-17. Sistema de revestimento. **6.** Secção transversal de lâmina foliar de *Metrodorea mollis*, mostrando epiderme unisseriada, tricomas tectores unicelulares (setas), tricoma glandular peltado (tp). Na região da nervura central é possível observar ainda cavidades secretoras (cs). **7**. Microscopia eletrônica de varredura da folha de *Esenbeckia irwiniana*. Notar a densa quantidade de tricomas na face abaxial. **8-9.** Epiderme dissociada de *Conchocarpus heterophyllus*. **8.** Tricoma tector multicelular. **9.** Tricoma glandular capitado, com pedúnculo multicelular e cabeça unicelular. **10-11.** Epiderme dissociada mostrando tricomas glandulares capitado, com pedúnculo multicelular e cabeça multicelular em *E. pilocarpoides* (**10**) e *E. irwiniana* (**11**). **12.** Secção transversal da folha de *M. mollis*, mostrando tricoma peltado associado à cavidade secretora, na região da nervura central. **13-15.** Dissociações da face abaxial da epiderme, todas apresentando estômatos anomocíticos. **13.** *E. grandiflora*, com tricoma tector unicelular (seta), paredes anticlinais retas. **14.** *M. stipularis*, com tricoma peltado (seta), paredes anticlinais sinuosas. **15.** *M. mollis*, com paredes anticlinais sinuosas e tricomas (setas). **16-17**. Dissociações da face adaxial da epiderme. **16.** *M. maracasana.* Paredes anticlinais sinuosas e tricoma peltado (seta). **17.** *M. stipularis.* Embora tenha paredes anticlinais sinuosas, a ondulação é mais discreta que nas demais espécies de *Metrodorea*. **Barras:** 6, 7, 13=100µm; 8,14-17=50µm; 9-10=20µm; 11-12=50µm.


tp
cs
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

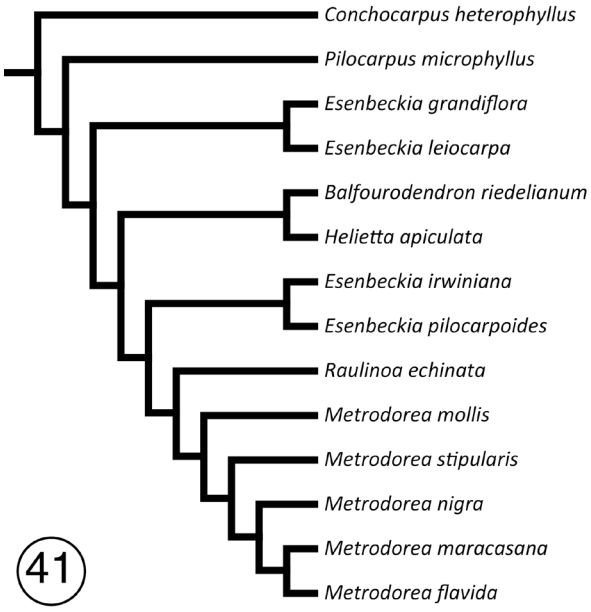
Figuras 18-29. Secções transversais da lâmina foliar. **18.** *Conchocarpus heterophyllus*. Drusa em uma das células da camada de células coletoras (cc). Apenas uma camada de parêquima paliçádico (pp) é observada. Nesta espécie, o parênquima lacunoso (pl) apresenta pequenos espaços intercelulares. **19.** *Metrodorea mollis.* Mesofilo dorsiventral, com apenas uma camada de parênquima paliçádico (pp) associada a uma camada de células coletoras (cc). O parênquima lacunoso (pl) apresenta células braciformes frouxamente dispostas. **20.** *M. nigra*. Organização do mesofilo semelhante à de *M. mollis*, contudo, a bainha parenquimática do feixe é mais evidente nesta espécie (seta). **21.** *Esenbeckia grandiflora.* Feixe vascular com bainha parenquimática (seta). **22.** *E. irwiniana*. Nesta espécie há extensões da bainha do feixe (setas). **23-24.** *M. maracasana***.** Região da nervura central. **23.** Detalhe dessa região, mostrando as células secretoras (seta), comuns em todas as espécies analisadas. **24.** Em menor aumento, dois arcos do sistema vascular (setas) circundados por fibras. Cavidades secretoras presentes próximo a face abaxial (cs). **25.** *E. irwiniana*. Nesta espécie, um terceiro arco no centro da nervura central corresponde ao arco medular (seta). **26.** *M. nigra*. Sob luz polarizada, é possível observar cristais em compartimentos no parênquima paliçádico (seta). Notar cavidade secretora circundada por células epiteliais (cs). **27.** *E. pilocarpoides.* Sob luz polarizada, observa-se feixe de ráfides (seta). **28.** *M. stipularis*. No parênquima paliçádico, cristais prismáticos são compartimentalizados por paredes transversais (seta) ao maior eixo da célula. **29.** *M. nigra*. Sob luz polarizada, exibe grande quantidade de cristais prismáticos, sobretudo nas camadas subepidérmicas na região da nervura central. **Barras:** 18-21,23,26-27=50µm; 22=100µm; 24-25,29=200µm; 28=20µm.

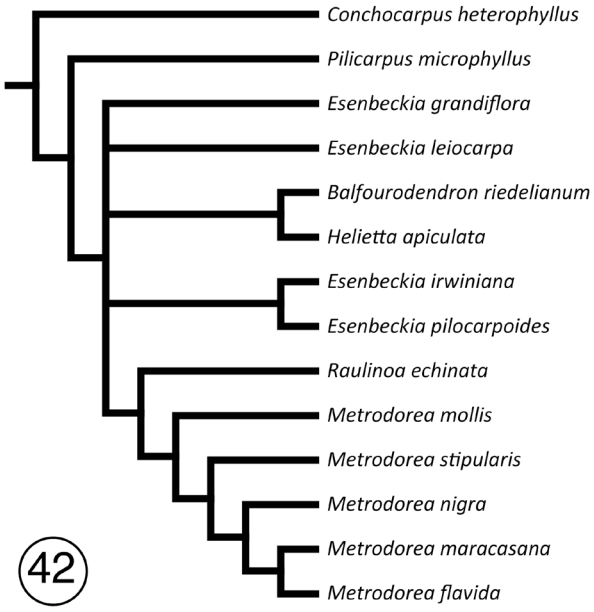

pp
cc
pl
18
pp
cc
pl
19
pp
cc
pl
20
21
22
23
cs
cs
24
25
cs
26
27
28
29

Figuras 30-40. Venação. **30.** *Metrodorea mollis***.** A partir da nervura principal (1), nervuras secundárias (2) ramificam-se em padrão pinado, sendo que esta ramificação é decurrente na base e excurrente no ápice. Nervuras intersecundárias (i2), terciárias (3) e quaternárias (4) são também indicadas. **31.** *Esenbeckia grandiflora*. Conexões excurrentes da nervura central (1) com as secundárias (setas). **32.** *Conchocarpus heterophyllus*. Ápice da folha, com conexões com a nervura central (1) decorrentes, como na base da folha. **33.** *M. nigra*. Nervuras terciárias que podem ser opostas (setas pretas) ou alternas (setas brancas), correspondendo ao padrão percurrente misto. **34.** *E. pilocarpoides* com nervuras quaternárias reticuladas irregulares com terminações ramificadas. Os pontos de encontro entre nervuras quaternárias são indicados por seta. **35.** Nervuras quaternárias (4) livremente ramificadas em *M. maracasana.* **36.** Aréolas (A) pouco desenvolvidas em *Helietta apiculata*. **37-38.** Aréolas bem desenvolvidas. **37.** *M. stipularis*. **38.** *E. irwiniana*. **39.** Venação última terminal incompleta em *E. grandiflora.* **40.** Venação última terminal em arcos em *M. nigra*. **Barras:** 30,32-33;37=3mm; 31=1mm; 34-35,38,40=400µm; 36=900µm; 39=500µm.


i2
1
2
3
4
30
1
31
1
32
33
34
4
4
4
35
A
A
A
A
A
36
37
38
39
40

Figuras 41-43. Reconstruções filogenéticas pelo método de máxima parcimônia. **41.** Uma das nove árvores mais parcimoniosas. **42.** Árvore de consenso estrito entre as nove árvores obtidas. **43.** À esquerda, árvore redesenhada de Dias et al (submetido), obtida por método de máxima parcimônia, contraposta, à direita, por árvore de consenso de maioria de análise de *bootstrap*, com 50% de corte em 10.000 replicações, com porcentagens obtidas sobre os ramos. A filogenia morfológica obtida, além de menos resolvida, diverge quanto à posição de *Metrodorea mollis*.


Conchocarpus heterophyllus
Pilocarpus microphyllus
Esenbeckia grandiflora
Esenbeckia leiocarpa
Balfourodendron riedelianum
Helietta apiculata
Esenbeckia irwiniana
Esenbeckia pilocarpoides
Raulinoa echinata
Metrodorea mollis
Metrodorea stipularis
Metrodorea nigra
Metrodorea maracasana
Metrodorea flavida
41


Conchocarpus heterophyllus
Pilicarpus microphyllus
Esenbeckia grandiflora
Esenbeckia leiocarpa
Balfourodendron riedelianum
Helietta apiculata
Esenbeckia irwiniana
Esenbeckia pilocarpoides
Raulinoa echinata
Metrodorea mollis
Metrodorea stipularis
Metrodorea nigra
Metrodorea maracasana
Metrodorea flavida
42

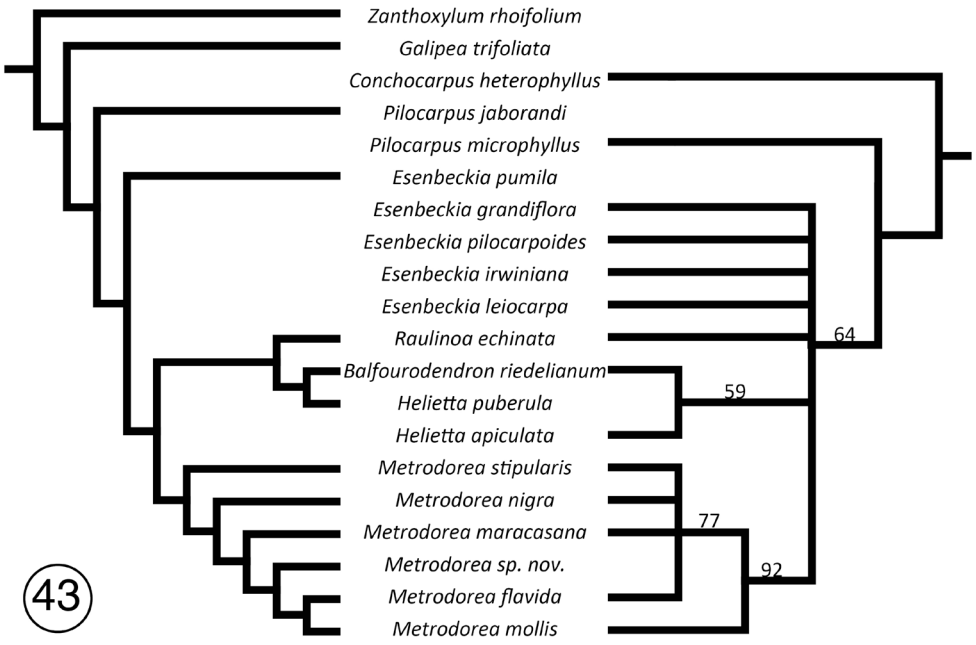

Zanthoxylum rhoifolium
Galipea trifoliata
Conchocarpus heterophyllus
Pilocarpus jaborandi
Pilocarpus microphyllus
Esenbeckia pumila
Esenbeckia grandiflora
Esenbeckia pilocarpoides
Esenbeckia irwiniana
Esenbeckia leiocarpa
Raulinoa echinata
Balfourodendron riedelianum
Helietta puberula
Helietta apiculata
Metrodorea stipularis
Metrodorea nigra
Metrodorea maracasana
Metrodorea sp. nov.
Metrodorea flavida
Metrodorea mollis
64
59
77
92
43

Figura 44. Possíveis sinapomorfias morfológicas de *Metrodorea* e suas relações infragenéricas de acordo com a filogenia de Dias et al. (submetido apud Dias et al. 2013).

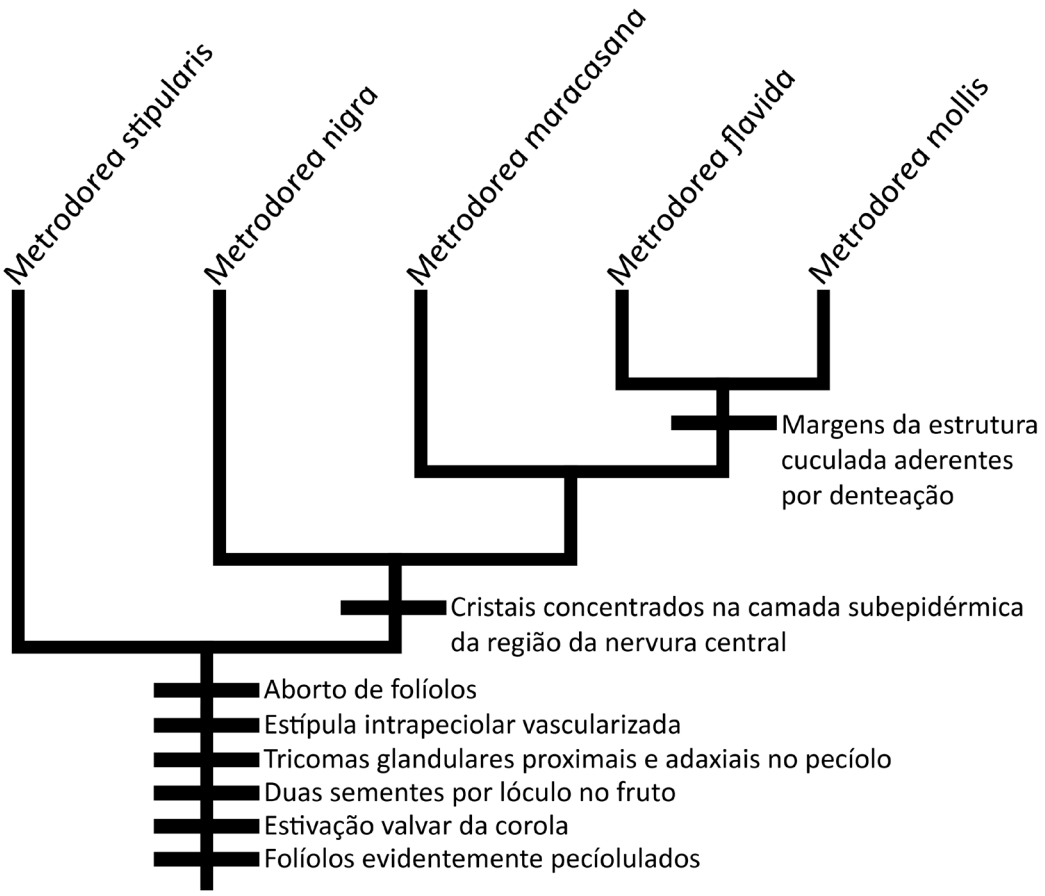
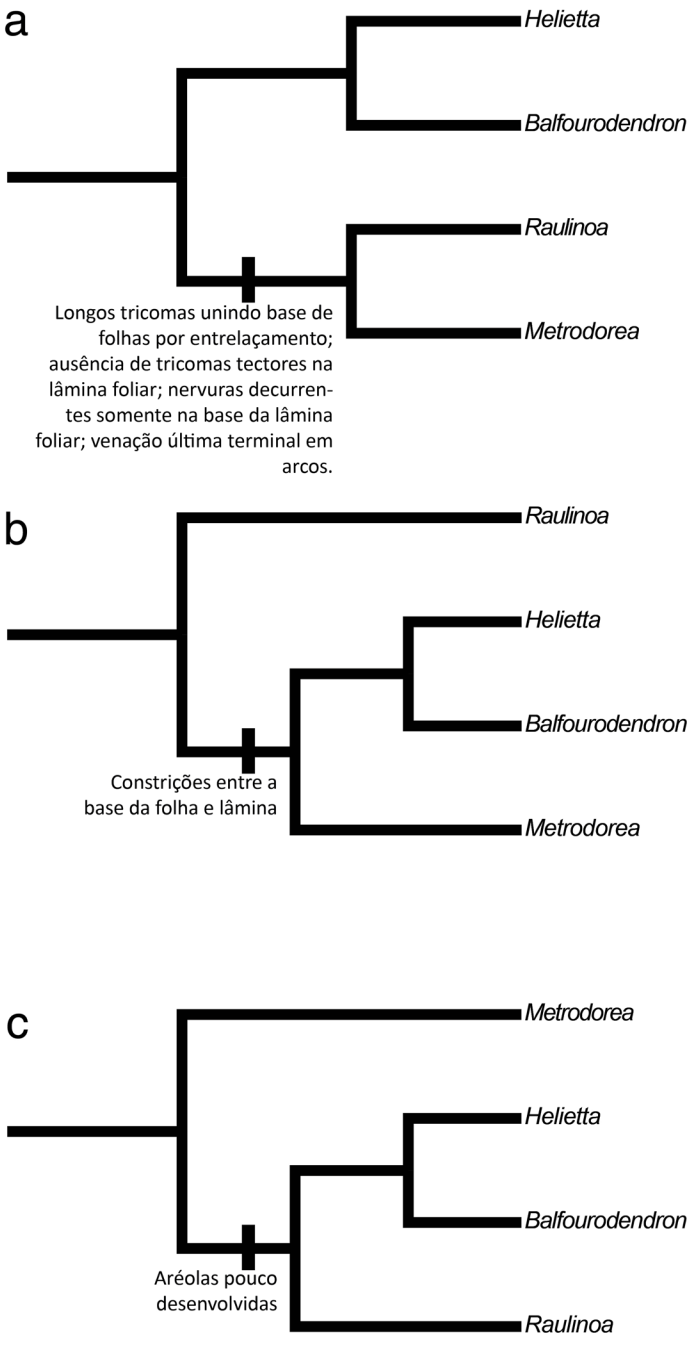

Metrodorea stipularis
Metrodorea nigra
Metrodorea maracasana
Metrodorea flavida
Metrodorea mollis
Margens da estrutura cuculada aderentes por denteação
Cristais concentrados na camada subepidérmica da região da nervura central
Aborto de folíolos
Estípula intrapeciolar vascularizada
Tricomas glandulares proximais e adaxiais no pecíolo
Duas sementes por lóculo no fruto
Estivação valvar da corola
Folíolos evidentemente pecíolulados

Figura 45. Possíveis sinapomorfias morfológicas para cada possibilidade de relações entre os gêneros *Metrodorea*, *Helietta*, *Balfourodendron* e *Raulinoa* obtidas nas diversas análises de Dias et al. (submetido). *Raulinoa* emergindo como grupo-irmão de *Metrodorea* encontra um maior número de sinapomorfias. Ao se aceitar uma das hipóteses, os estados de caráter que sustentam as outras hipóteses tornam-se ambíguos, exigindo a aceitação de homoplasias para explicar suas origens. Escolher a hipótese a, então, torna-se a opção mais parcimoniosa.


a
Helietta
Balfourodendron
Raulinoa
Metrodorea
Longos tricomas unindo base de folhas por entrelaçamento; ausência de tricomas tectores na lâmina foliar; nervuras decurrentes somente na base da lâmina foliar; venação última terminal em arcos.
b
Raulinoa
Helietta
Balfourodendron
Metrodorea
Constrições entre a base da folha e lâmina
c
Metrodorea
Helietta
Balfourodendron
Raulinoa
Aréolas pouco desenvolvidas

Considerações Finais

Considerações Finais

Rutaceae, uma família de grande importância econômica (cultura de citros e o extração de madeira do pau-marfim), médica (alcaloides extraídos do gênero *Pilocarpus*) e cultural (a atribuição popular de poderes mágicos à arruda), emerge também como interessante modelo para a compreensão das possibilidades de evolução morfológica da folha, dada sua diversidade quanto à sua divisão e quanto às modificações da base foliar. Com a obtenção de novas filogenias, que questionam antigas classificações estritamente baseadas em morfologia, faz-se necessária a obtenção de novos caracteres morfoanatômicos que tornem explícitos os novos agrupamentos em novos tratamentos taxonômicos, juntando a informação evolutiva à finalidade prática de identificação.

O primeiro capítulo propõe uma abordagem contínua para a compreensão da tão debatida divisão entre folhas simples e compostas do grupo, bem como a natureza de suas bases e articulações. A plasticidade com que a família modificou, ao longo de sua filogenia, o número de folíolos em cada folha possivelmente é relacionada com um grau de determinação do desenvolvimento do primórdio foliar. E as estruturas cuculadas em *Metrodorea*, outrora tidas como bainhas, representam estípulas intrapeciolares: legítimas projeções da base da folha que se iniciam, em seu desenvolvimento, pareadas e que protegem o ápice caulinar e gemas axilares.

O segundo capítulo apresenta uma descrição anatômica minuciosa das folhas de muitas espécies cuja classificação vem sendo debatida nos últimos anos. Ao serem confrontados com estudos filogenéticos, os dados mostram que a morfologia não deve ser tomada como inimiga das novas classificações baseadas em dados moleculares, mas sim, reavaliadas, dentro do seu contexto evolutivo. Novos dados morfológicos podem muito bem corroborar novas classificações, emergindo como poderosos aliados no entendimento da história do grupo. E mesmo antigos dados, se revelados homoplásticos, passam a ser melhor compreendidos. Daí a importância, em um contexto de fácil obtenção de filogenias, de prosseguir com estudos morfoanatômicos. E neste estudo, apontamos uma série de características morfoanatômicas como possíveis sinapomorfia de alguns grupos.

Metrodorea A. St.-Hill., o gênero que protagoniza estes estudos nesta dissertação, jun-

to com suas espécies aparentadas findam este trabalho melhor compreendidas. Este trabalho contribui com dados inéditos que serão adicionados à literatura de Rutaceae, gerado uma reinterpretação mais clara da morfologia do grupo conhecida até então e abrindo perspectivas para que novos gêneros da família, e mesmo famílias relacionadas, sejam estudadas sob uma óptica semelhante a nossa.

Importante ressaltar também que, apesar de esforços antigos e recentes, há uma lacuna de conhecimento morfoantômico e ontogenético na família, que não se restringe às estruturas foliares, mas a todos os órgãos, vegetativos e reprodutivos, em diversos grupos. No ímpeto de se esclarescer as relações infrafamiliares, deve-se observar a relevância dos estudos morfológicos. E tal lacuna não deve ser vista com pessimismo, mas sim, como motivadora e geradora de possibilidades para o engrandecimento científico.