



MAKELI GARIBOTTI LUSA

**"MORFOANATOMIA E FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DA SUBTRIBO
LYCHNOPHORINAE (ASTERACEAE: VERNONIEAE) COMO SUBSÍDIOS PARA
AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS DO GRUPO"**

**"MORPHOANATOMY AND PHYTOCHEMISTRY OF SPECIES OF
LYCHNOPHORINAE SUBTRIBE (ASTERACEAE: VERNONIEAE) AS SUBSIDIES
FOR THE PHYLOGENETIC ANALYSES OF GROUP"**

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MAKELI GARIBOTTI LUSA

**“MORFOANATOMIA E FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES DA SUBTRIBO
LYCHNOPHORINAE (ASTERACEAE: VERNONIEAE) COMO SUBSÍDIOS PARA
AS ANÁLISES FILOGENÉTICAS DO GRUPO”**

**“MORPHOANATOMY AND PHYTOCHEMISTRY OF SPECIES OF
LYCHNOPHORINAE SUBTRIBE (ASTERACEAE: VERNONIEAE) AS SUBSIDIES
FOR THE PHYLOGENETIC ANALYSES OF GROUP”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pela candidata

Makeli Garibotti Lusa


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Doutora em Biologia
Vegetal.

Thesis presented to the Institute of Biology
the State University of Campinas in partial
fulfillment of the requirements of the degree
of Doctor in Plant Biology.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

L975m Lusa, Makeli Garibotti, 1982-
Morfoanatomia e fitoquímica de espécies da subtribo Lychnophorinae
(Asteraceae: Vernonieae) como subsídios para as análises filogenéticas do grupo
/ Makeli Garibotti Lusa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Beatriz Appezzato da Glória.

Coorientador: Fernando Batista da Costa.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Asteraceae. 2. Campos rupestres. 3. Estruturas secretoras. 4. Parede celular. 5. Filogenia. I. Appezzato-da-Glória, Beatriz. II. Da Costa, Fernando Batista. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Morphoanatomy and phytochemistry of species of Lychnophorinae subtribe (Asteraceae: Vernonieae) as subsidies for the phylogenetic analyses of group

Palavras-chave em inglês:

Asteraceae

Rupestrian fields

Secretory structures

Cell wall

Phylogeny

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutora em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Beatriz Appezzato da Glória [Orientador]

Cleusa Bona

Élder Antônio Souza e Paiva

Juliana Lischka Sampaio Mayer

André Olmos Simões

Data de defesa: 26-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 26 de agosto de 2014

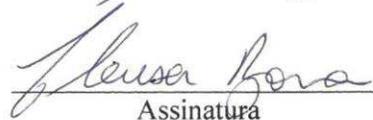
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória (orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Cleusa Bona



Assinatura

Prof. Dr. Élder Antônio Sousa e Paiva



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer



Assinatura

Prof. Dr. André Olmos Simões



Assinatura

Profa. Dra. Juliana Marzinek

Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

Profa. Dra. Sandra Maria Carmello Guerreiro

Assinatura

RESUMO

Asteraceae é uma das maiores famílias entre as angiospermas, possuindo de 24.000 a 30.000 espécies, o que representa, aproximadamente, 10% da flora mundial. Atualmente são reconhecidas 21 subtribos pertencentes à Vernoniae. Entre elas, Lychnophorinae tem uma distribuição quase restrita ao Brasil, ocorrendo nos campos rupestres e cerrados do Planalto Central. A subtribo apresenta 18 gêneros e 104 espécies, distribuídos entre os mais variados hábitos: ervas perenes, arbustos, subarbustos, arvoretas, árvores e caulirosetum. Estudos filogenéticos recentes indicam que a subtribo é monofilética. As linhagens mais basais e mais derivadas são bem sustentadas, contudo, as relações entre os demais clados persistem apenas parcialmente resolvidas. Por esse motivo, nesse estudo são investigadas espécies da subtribo em relação à morfoanatomia e à química dos principais metabólitos de caules aéreos e folhas, buscando-se novos caracteres que possam ser úteis para um melhor entendimento evolutivo do grupo, inclusive possíveis sinapomorfias. Para tanto, foram eleitas espécies chaves dentro de Lychnophorinae, representantes das principais linhagens. Para as análises estruturais e histoquímicas, amostras de caules e de folhas foram processadas de acordo com as técnicas usuais em anatomia vegetal. Para as análises fitoquímicas, os extratos foram analisados por cromatografia líquida e espectrometria de massas. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres foram efetuadas em uma filogenia baseada em dados morfológicos e moleculares. Em Lychnophorinae, os principais locais de síntese dos metabólitos secundários são: tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos das folhas e dos caules. As análises fitoquímicas evidenciaram a presença de flavonoides, derivados do ácido *trans*-cinâmico, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos. A reconstrução dos estados ancestrais dessas substâncias na filogenia da subtribo indicam possíveis sinapomorfias

químicas. No decorrer das análises morfoanatômicas foram observadas duas importantes novidades em Lychnophorinae. A primeira relata a ocorrência de fitomelanina em caules aéreos e folhas de Lychnophorinae. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres sugerem que o ancestral comum mais recente das Lychnophorinae já apresentava fitomelanina no caule espessado. A segunda novidade morfoanatômica diz respeito a um modo não usual de retenção de água sobre ápices caulinares, onde uma substância hialina é resultado da degradação parietal de tricomas não glandulares, tendo natureza hidrofílica. Essa substância possivelmente apresenta a função de proteger os órgãos jovens contra dessecação. Durante as investigações anatômicas de caules e folhas de Lychnophorinae, nós observamos características peculiares, frequentemente relatadas como xéricas, e procuramos entender se tais características mostravam algum padrão que agrupava as espécies. Nós realizamos análises multivariadas levando em consideração tais características. Os resultados indicaram quatro grupos funcionais em Lychnophorinae e sinalizaram que as espécies agrupadas, ocupavam os mesmos nichos, os quais refletiam condições específicas nos diferentes ambientes. Finalmente, após a conclusão das análises anatômicas, as características foram mapeadas na filogenia de Lychnophorinae e geraram importantes informações, como a identificação de oito possíveis sinapomorfias. As informações geradas nesse estudo sugerem que a evolução da diversidade morfológica e anatômica em Lychnophorinae pode ter sido direcionada por pressões adaptativas, derivadas de fatores ecofisiológicos dos ambientes restritos em que habitam a maioria das espécies.

Palavras-chave: Lychnophorinae, *campos rupestres*, grupos funcionais, fitomelanina, degradação de parede celular, retenção de água, estruturas secretoras, sinapomorfias químicas, sinapomorfias morfoanatômicas.

ABSTRACT

Asteraceae is one of the largest flowering plants families, with 24,000-30,000 species, representing approximately 10% of the world's flora. Currently, 21 subtribes are recognized in Vernoniaeae. Among them, Lychnophorinae is nearly endemic to Brazil, occurring in *campos rupestres* areas and savannas of Central Plateau. The subtribe has 18 genera and 104 species distributed among the various habits: perennial herbs, shrubs, subshrubs, treelets, trees and caulirosetum. Recent phylogenetic studies show that the subtribe is monophyletic. The most basal and more derived strains are well supported, however, relationships between the remaining clades persist partially unresolved. Therefore, in this study, species of the subtribe are investigated in relation to morphoanatomy and chemistry of the main metabolites of aerial stems and leaves, searching for new characters that might be useful for a better understanding of the group evolution, including possible synapomorphies. To this aim, key species were chosen in Lychnophorinae, representing the principal lineages. For structural and histochemical analyzes, samples of leaves and stems were processed according to usual plant anatomy techniques. For phytochemical analysis, the extracts were analyzed by liquid chromatography and mass spectrometry. Reconstructions of ancestral states of the characters was performed using parsimony in a phylogeny based on morphological and molecular data. In Lychnophorinae, the major sites of synthesis of secondary metabolites are: glandular trichomes, epidermal idioblasts and parenchyma of the leaves and stems. The phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, derivatives of trans-cinnamic acid, sesquiterpene lactones and polyacetylenes. The reconstruction of ancestral states of these substances in the phylogeny of the subtribe indicate possible chemical synapomorphies. During the morphoanatomic analyzes two important events in Lychnophorinae were

observed. The first reports the occurrence of phytomelanin aerial stems and leaves of Lychnophorinae. Reconstructions of ancestral states of the characters suggest that the most recent common ancestor of Lychnophorinae presented phytomelanin in thickened stem. The second morphoanatomical novelty relates to a method of unusual water retention of apices, where a substance hyaline is a result of parietal degradation of non glandular trichomes, and it has hydrophilic nature. This substance probably has the function to protect young organs from desiccation. During the anatomical investigations of stems and leaves of Lychnophorinae, we observed frequently reported as xeric peculiar characteristics, and seek to understand whether these characteristics showed some pattern that grouped species. We performed multivariate analysis taking into account the peculiar characteristics. The results indicated four functional groups Lychnophorinae and signaled that grouped species occupy the same niche, which reflect specific conditions in different environments. Finally, after completing the anatomical analyzes, the features were mapped on the phylogeny of Lychnophorinae and generated important information such as the identification of eight possible synapomorphies. The information generated in this study suggest that the evolution of morphological and anatomical diversity in Lychnophorinae may have been driven by adaptive pressures, derived from ecophysiological factors of restricted environments in which most species inhabit.

Key-words: Lychnophorinae, *campos rupestres*, functional groups, phytomelanin, cell wall degradation, water retention, secretory structures, chemical synapomorphy, morphoanatomical synapomorphy.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xvii
INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	24
ESTRUTURAÇÃO DA TESE	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO 1	31
Histolocalização, fitoquímica e evolução dos metabólitos secundários nas <i>Lychnophorinae</i> (<i>Vernonieae</i> : <i>Asteraceae</i>)	31
RESUMO	33
MATERIAL E MÉTODOS	38
<i>Caracterização micromorfológica</i>	40
<i>Análise fitoquímica e preparo dos extratos</i>	41
<i>Análises por UHPLC-UV-MS</i>	43
<i>Identificação dos picos cromatográficos</i>	44
<i>Codificação dos caracteres e reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres na filogenia</i>	44
RESULTADOS	45
<i>Histoquímica e identificação das fases de secreção nas folhas e caules</i>	45
<i>Estrutura dos tricomas glandulares</i>	52
<i>Caracterização fitoquímica</i>	54
<i>Reconstrução dos estados ancestrais dos metabólitos secundários na filogenia</i>	59
DISCUSSÃO	68
<i>Histoquímica e localização dos metabolitos secundários</i>	68
<i>Caracterização fitoquímica versus localização da secreção</i>	71
<i>Evolução dos metabólitos secundários na filogenia de <i>Lychnophorinae</i></i>	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

CAPÍTULO 2	83
Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos e folhas de <i>Lychnophorinae</i> (<i>Vernonieae</i> : <i>Asteraceae</i>).....	83
RESUMO.....	85
INTRODUÇÃO	87
MATERIAL E MÉTODOS	89
<i>Material botânico</i>	89
<i>Caracterização micromorfológica</i>	90
<i>Identificação da fitomelanina nas secções histológicas</i>	91
<i>Padrão de evolução da fitomelanina e codificação dos caracteres</i>	91
RESULTADOS.....	92
<i>Deposição da fitomelanina e ocorrência nos órgãos</i>	92
<i>Padrões de deposição de fitomelanina</i>	97
<i>Reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres</i>	100
DISCUSSÃO	112
<i>Caracterização da fitomelanina em órgãos aéreos</i>	112
<i>Distribuição da fitomelanina nos tecidos e hipóteses adaptativas</i>	115
<i>Padrões evolutivos da fitomelanina</i>	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
DADOS SUPLEMENTARES	123
CAPÍTULO 3	131
Trichomes related to an unusual way for water retention and protection of the stem apex in <i>Lychnophora diamantinana</i> (<i>Asteraceae</i>).....	131
ABSTRACT.....	135
INTRODUCTION.....	137
MATERIALS AND METHODS.....	138
RESULTS	140
DISCUSSION.....	148
ACKNOWLEDGEMENTS.....	153

LITERATURE CITED.....	153
CAPÍTULO 4	159
Functional groups in Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on morphological and anatomical traits.....	159
(Artigo publicado na revista <i>Australian Journal of Botany</i> Vol. 62, p 150-163, 2014).....	159
ABSTRACT.....	163
INTRODUCTION.....	165
MATERIALS AND METHODS.....	167
<i>Environmental characterisation</i>	167
Plant material	170
Trait measurements	171
Statistical analyses.....	172
RESULTS.....	177
DISCUSSION.....	187
ACKNOWLEDGEMENTS.....	193
REFERENCES.....	194
APPENDIX.....	201
CAPÍTULO 5	207
Morfoanatomia das Lychnophorinae numa perspectiva filogenética.....	207
RESUMO.....	209
INTRODUÇÃO	211
MATERIAL E MÉTODOS	213
<i>Material botânico</i>	213
<i>Caracterização micromorfológica</i>	214
<i>Codificação dos caracteres e mapeamento na filogenia</i>	215
RESULTADOS.....	218
<i>Morfologia e anatomia dos caules e folhas</i>	218
Caules	218
Folhas	231
<i>Mapeamento dos caracteres morfológicos e anatômicos na filogenia de Lychnophorinae</i>	242

Caule.....	242
Folha.....	253
DISCUSSÃO	275
<i>Morfologia e anatomia dos caules e folhas</i>	<i>275</i>
<i>Mapeamento dos caracteres morfológicos e anatômicos na filogenia de Lychnophorinae</i>	<i>277</i>
Caule.....	277
Folha.....	279
<i>Hipótese da caracterização do caule e da folha no ancestral das Lychnophorinae</i>	<i>283</i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	284
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	286
APÊNDICES.....	291
CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE..	297

*Dedico esse trabalho ao meu amado esposo Marcelo,
com toda a gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Profa. Dra. Beatriz Appezzato-da-Glória pela acolhida durante o desenvolvimento do doutorado, pelas discussões enriquecedoras e pelos valiosos ensinamentos a cerca da pesquisa e do ensino.

Ao Prof. Fernando Batista da Costa por aceitar me orientar em área tão distinta, pelo apoio, pela confiança e por todo o suporte técnico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, por possibilitar a realização desse doutorado. Aos professores do programa por compartilharem conhecimento e amizade e à Maria Roseli, pela constante disponibilidade em nos auxiliar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão das bolsas de Doutorado (2010/02085-5) e de Estágio de Pesquisa no Exterior (2012/16071-1) e pelo apoio ao Projeto Temático 2010/51454-3. E à Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior, pelos dois primeiros meses de bolsa.

Ao Instituto Estadual de Florestas, de Minas Gerais, pelo suporte logístico nos Parques Estaduais.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal (de antes e de agora) às "Alines", Adriana, Arinawa, Elaine, Graça, João Marcelo, João Paulo, Juliana, Magda, Marta, Michelly e Tuane, por toda a amizade, pela gostosa convivência, pela colaboração e pelo apoio, os quais contribuíram diretamente para o desenvolvimento desse estudo. E à Marli, especialmente, por estar sempre pronta a nos ajudar e pela amizade.

Ao Benoit Loeuille, pela colaboração e por todo o apoio.

Ao Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo apoio técnico. E à toda a equipe e amigos do laboratório, pelos auxílios, pelo apoio e pela amizade. Em especial, gostaria de agradecer à Dani Chagas, à Marô, à Dani Faleiro e à Rosana, pelo suporte científico e pela amizade.

À equipe do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA – ESALQ/USP) pelo apoio no uso dos equipamentos.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biosciências da UNESP-Botucatu pelo apoio técnico na preparação das amostras e no uso dos equipamentos.

À Dra. Juliana Marzinek pelas conversas, pelo material de pesquisa compartilhado e pelo apoio.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, pela amizade e pelo apoio.

Às minhas amigas, Elaine, Jenifer e Jocieli, que mesmo de longe continuaram sempre presentes me apoiando e confortando.

À Juliana Mayer, pela amizade, pela disponibilidade e incentivo constantes.

À minha querida família, pai, mãe, Liz, Quel, Marci e Murilinho, à Dona Margarete e ao Sr. Emílio, por toda a compreensão, por todo amor, dedicação, confiança e apoio incondicionais.

Ao meu amado esposo Marcelo, companheiro com todas as letras, pelo carinho, por tornar minha vida mais iluminada... E por todo o apoio direto no presente trabalho, nas coletas, nas pranchas, na preparação da tese, etc.

A Deus, por tudo e por estar presente na minha vida através de tantos...

A todos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento desse estudo, Muito

Obrigada!

INTRODUÇÃO

Asteraceae é uma das maiores famílias entre as angiospermas, possuindo cerca de 1.600-2000 gêneros e 24.000-30.000 espécies, o que representa, aproximadamente, 10% da flora mundial (Funk *et al.*, 2005; Jeffrey, 2007; Funk *et al.*, 2009). A família está distribuída por todos os continentes, exceto o Antártico, com origem na América do Sul (DeVore e Stuessy, 1995; Funk *et al.*, 2009). Ainda, de acordo com os autores, o sucesso do grupo pode estar relacionado à ocorrência de metabólitos secundários muito ativos, além de mecanismos de dispersão eficientes.

A família é composta por ervas, subarbustos, arbustos, arvoretas e árvores. As principais características da família são: flores agregadas em capítulos envolvidos por um involúcro de brácteas; sépalas altamente modificadas, formando um papus; e anteras, normalmente conatas com apresentação secundária de pólen pelo estilete (Bremer, 1994; Funk *et al.*, 2005, 2009; Judd *et al.*, 2007). Quimicamente, a família é caracterizada por terpenoides, em especial lactonas sesquiterpênicas, bem como poliacetilenos e compostos fenólicos, tais como flavonoides e derivados do ácido cafeico (Judd *et al.*, 2007). Atualmente são reconhecidas 12 subfamílias e 43 tribos (Funk *et al.*, 2009). Filogenias baseadas em dados moleculares (marcadores nucleares e cloroplásticos) e, ou morfológicos mostram que a família é monofilética (Jansen e Palmer, 1987; Bremer, 1992; Kim *et al.*, 1992; Panero e Funk, 2002; Funk *et al.*, 2009).

Vernonieae é uma das maiores tribos de Asteraceae, contendo cerca de 129 gêneros e 1.100 espécies (Bremer, 1994; Keeley e Robinson, 2009). Os indivíduos são pantropicais, ocorrendo na América do Sul (especialmente no Brasil), América Central e do Norte, África

tropical e do Sul e Madagascar; alguns gêneros ocorrem na Ásia tropical e, apenas um gênero, no norte da Austrália (Bremer, 1994; Keeley e Robinson, 2009). Os táxons pertencentes à Vernonieae apresentam hábitos amplamente variados, desde pequenas ervas até grandes árvores; possuem, em geral, folhas alternas ou em roseta basal; o capítulo é discoide, com flores brancas, rosas, violetas, azuis, púrpuras, raramente vermelhas ou amarelas. A característica mais distintiva das Vernonieae é fornecida pelos estiletos, que são esguios com ramos filiformes pilosos e com uma haste superior pilosa (Bremer, 1994; Keeley e Robinson, 2009).

A classificação subtribal e a delimitação dos gêneros em Vernonieae é mal compreendida, devido ao grande tamanho e à distribuição de “*Vernonia*” (tradicionalmente tratado como gênero núcleo da tribo) e à ocorrência de muitos gêneros monotípicos ou com poucas espécies (Bremer, 1994; Keeley *et al.*, 2007; Keeley e Robinson, 2009). Historicamente a tribo tem sido organizada em torno de *Vernonia* (1.000-1.500 espécies), mas estudos mais recentes indicaram que o grupo seria parafilético ou polifilético e uma classificação subtribal foi proposta, restringindo *Vernonia* a poucas espécies (Bremer, 1994; Keeley *et al.*, 2007; Keeley e Robinson, 2009). As análises moleculares já realizadas sustentam fortemente a monofilia da tribo (Funk *et al.*, 2005; Goertzen *et al.*, 2003; Panero e Funk, 2002). Contudo os problemas em relação à delimitação das subtribos e dos gêneros de Vernonieae e às suas relações ainda permanecem não resolvidos (Keeley *et al.*, 2007; Keeley e Robinson, 2009).

Atualmente são reconhecidas 21 subtribos pertencentes à Vernonieae. Entre elas, Lychnophorinae tem uma distribuição quase restrita ao Brasil (com apenas uma espécie boliviana), ocorrendo nos campos rupestres e cerrados do Planalto Central. De acordo com

Loeuille (2011), a subtribo compreende ervas perenes, arbustos, subarbustos, arvoretas, árvores e caulirosuleto (sensu Cuatrecasas 1933, 2013). Esse hábito será descrito em detalhes no Capítulo 5. Tradicionalmente, a subtribo é caracterizada por capítulos que possuem, frequentemente, poucas flores, geralmente agregados em agrupamentos densos, porém atualmente são reconhecidas espécies que apresentam flores com capítulos separados (Bremer, 1994; Keeley e Robinson, 2009). Além disso, algumas características definem a subtribo (embora não sejam exclusivas para o grupo), como por exemplo a presença de pubescência geralmente conspícua com tricomas em forma de “T”, a presença de células esclerificadas e a ausência de glândulas nos apêndices das anteras e os grãos de pólen do tipo A (Keeley e Robinson, 2009). Quimicamente são reconhecidos na subtribo terpenoides (principalmente lactonas sesquiterpênicas), flavonoides, derivados do ácido quínico (ou *trans*-cinâmico), acetilenos e outras substâncias menos frequentes (Keles *et al.*, 2010). Entre as lactonas sesquiterpênicas, a presença de heliangólidos nas partes aéreas é considerada a única sinapomorfia que caracteriza a subtribo Lychnophorinae (Loeuille, 2011).

Os gêneros reconhecidos em Lychnophorinae são: *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Eremanthus*, *Lychnophora*, *Lychnophoropsis*, *Minasia*, *Paralychnophora*, *Piptolepis*, *Prestelia*, *Proteopsis* e *Vinicia* (Robinson, 2007; Keeley e Robinson, 2009). Recentemente, resultados da filogenia de Lychnophorinae, utilizando dados morfológicos e moleculares (Loeuille, 2011), indicaram que a subtribo é monofilética, quando inclui as subtribos Centratherinae e Sipolesiinae e os gêneros monoespecíficos *Albertinia*, *Blanchetia* e *Gorceixia* (Fig. 1). Dessa maneira, Loeuille (2011) propõe uma nova circunscrição para a subtribo, incluindo os gêneros *Albertinia*, *Blanchetia*, *Gorceixia*, *Heterocoma*, *Hololepis* e separando o gênero polifilético *Lychnophora* em três gêneros monofiléticos: *Lychnophora*

sensu stricto, *Lychnopcephalus* e um novo gênero descrito, *Lychnophorella*. Assim, a subtribo apresenta atualmente 18 gêneros e 104 espécies (na presente tese, *Lychnocephalus* e *Lychnophorella* são ainda tratados como *Lychnophora*, pois os primeiros gêneros ainda não foram publicados). *Albertinia*, *Blanchetia* e *Gorceixia* são reconhecidas como as linhagens mais “basais”, enquanto *Eremanthus* sensu stricto e *Lychnophora* sensu stricto emergiram como o clado mais “derivado”, que contém metade das espécies da subtribo. Contudo, as relações entre os demais clados persistem apenas parcialmente resolvidas (Loeuille, 2011).

Por esse motivo, nesse estudo são investigadas espécies da subtribo em relação à morfoanatomia e à composição química de caules aéreos e folhas, buscando-se novos caracteres que possam ser úteis para um melhor entendimento evolutivo do grupo. Para tanto foram eleitas espécies chaves dentro da subtribo, levando-se em conta representantes das linhagens principais: *Anteremanthus hatschbachii*, *Blanchetia heterotricha*, *Chronopappus bifrons*, *Eremanthus polycephalus*, *Heterocoma gracilis*, *Lychnophora diamantinana*, *L. tomentosa*, *L. triflora*, *Minasia scapigera*, *Paralychnophora bicolor*, *Piptolepis monticola*, *Prestelia eriopus* e *Proteopsis argentea*.

A escolha dos órgãos a serem investigados baseou-se no fato de que muitas espécies da subtribo são ameaçadas de extinção (46 espécies, de acordo com Nakajima, 2013). Como a maioria das espécies são árvores, arvoretas e arbustos, não seria viável a análise dos sistemas subterrâneos em tais espécies. Adicionalmente, além do fato de os órgãos vegetativos aéreos serem mais abundantes do que as estruturas reprodutivas, esses órgãos tem sido tradicionalmente utilizados para as investigações quimiotaxonômicas e quimioevolutivas em Lychnophorinae (Keles *et al.* 2010).

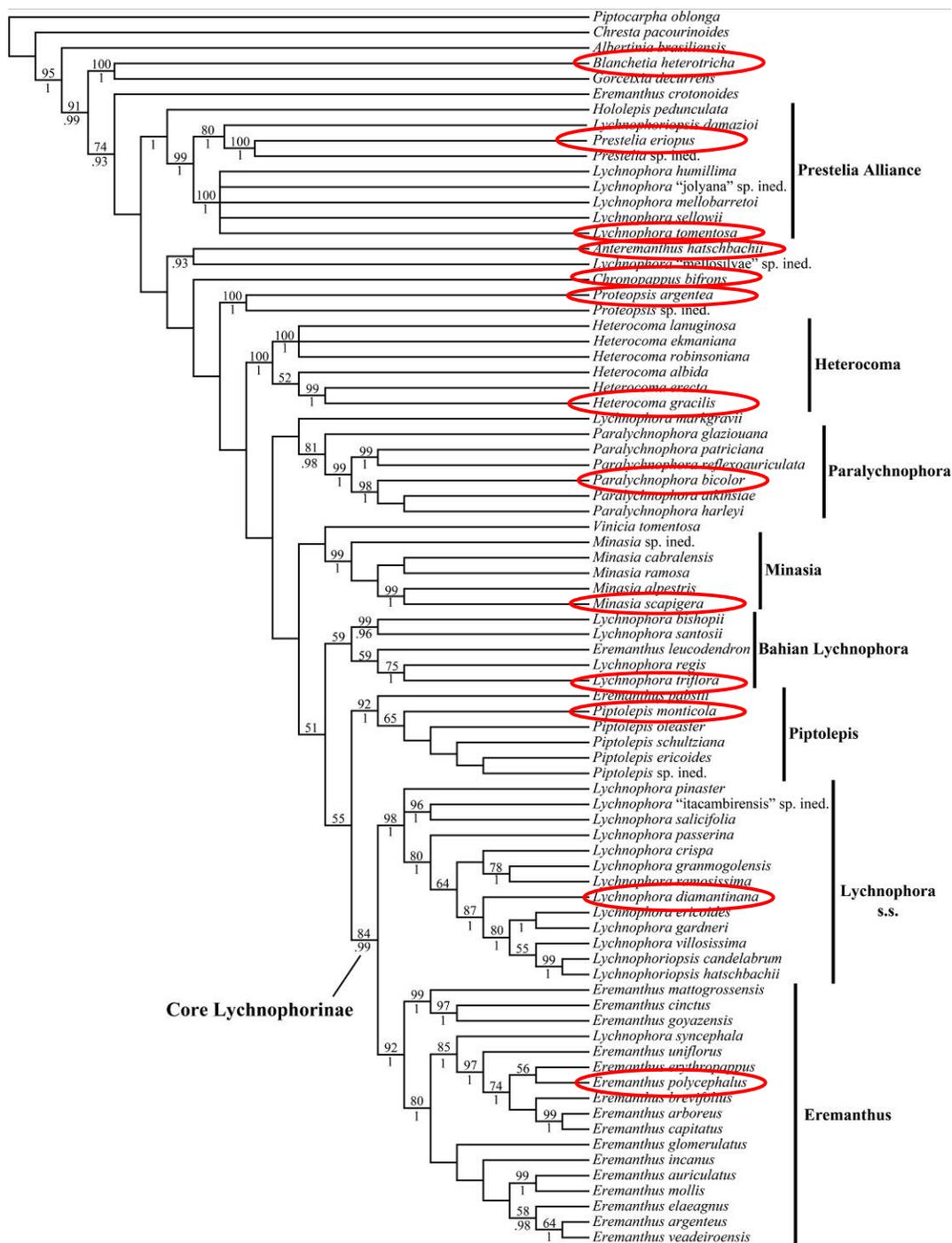


Figura 1. Árvore de consenso estrito de 44 árvores igualmente parcimoniosas resultante da análise combinada de dados moleculares (ITS, ETS, ndhF e rpl32-trnL) e morfológicos, realizada por Loeuille (2011).

OBJETIVOS

Os objetivos principais dessa tese foram:

- a) Identificar os locais de secreção e armazenamento dos metabólitos secundários, principalmente das classes químicas de maior interesse para a quimiotaxonomia e quimioevolução da subtribo;
- b) Investigar a composição dos metabólitos secundários, mapeá-los na filogenia da subtribo e se possível, indicar possíveis sinapomorfias químicas;
- c) Analisar a morfoanatomia caulinar e foliar nas espécies acima relacionadas, visando levantar caracteres com valor diagnóstico para o grupo;
- d) Indicar a evolução de caracteres morfoanatômicos ao longo da filogenia das Lychnophorinae, procurando identificar possíveis sinapomorfias morfoanatômicas.

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Para determinar como deveriam ser conduzidas as investigações fitoquímicas nas espécies de Lychnophorinae eleitas no estudo, primeiramente foram realizadas as análises histoquímicas, visando identificar os locais de secreção e armazenamento dos prováveis metabólitos de interesse. A partir disso, foram escolhidos os métodos mais adequados para a extração das substâncias de interesse. As análises fitoquímicas resultaram na identificação de substâncias pertencentes às seguintes classes metabólicas: lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, derivados do ácido *trans*-cinâmico e poliacetilenos. Esses dados permitiram que

se realizasse a reconstrução dos estados ancestrais dessas substâncias na filogenia mais recente de Lychnophorinae (Loeuille, 2011) e através desse mapeamento buscou-se identificar possíveis sinapomorfias químicas para o grupo (**Capítulo 1**).

No decorrer dos estudos anatômicos foram observadas duas singularidades. A primeira dizia respeito a uma substância enegrecida, amplamente observada nos caules das espécies de Lychnophorinae estudadas, sobre a qual não havia informações na literatura e cuja composição não era detectável através de testes histoquímicos. Através de análises comparativas com lâminas histológicas de cipselas de algumas espécies de Asteraceae, que apresentavam fitomelanina, deduziu-se que se tratava da mesma substância, ocorrendo em órgãos vegetativos aéreos. A partir disso, conduziu-se um estudo para identificar como era a distribuição da fitomelanina nos caules e folhas nas espécies da subtribo. Em seguida, foram amostradas 62 espécies (além das 13 previamente analisadas) através de material herborizado, visando identificar a presença ou a ausência de fitomelanina nos tecidos dos caules e nas folhas; mapeá-los na filogenia mais recente da subtribo; e indicar os possíveis padrões evolutivos para a ocorrência dessa substância nos órgãos (**Capítulo 2**).

A segunda singularidade observada em Lychnophorinae foi a presença de uma substância hialina nos ápices caulinares de *Lychnophora diamantinana*, uma espécie endêmica dos campos rupestres. A partir da observação macroscópica dessa substância, foram realizados estudos visando determinar qual era a estrutura responsável pela sua formação (**Capítulo 3**).

Além disso, no decorrer desse estudo, resultados das análises anatômicas indicaram que a maioria das espécies apresentava características anatômicas peculiares, tradicionalmente consideradas na literatura como xerofíticas (Fahn e Cutler, 1992; Turner,

1994; Dickison, 2000). Essa informação nos motivou a investigar se tais características poderiam ser consideradas possíveis adaptações aos ambientes de ocorrência das espécies. Além disso, levando em consideração tais características, buscou-se esclarecer se as espécies indicavam algum padrão de agrupamento entre si nos ambientes de ocorrência das Lychnophorinae (**Capítulo 4**).

Finalmente, em relação à morfoanatomia, observou-se que as características caulinares variavam principalmente de acordo com o hábito apresentado pela espécie, sendo observados dois padrões, um para as espécies com hábito caulirosula (sensu Cuatrecasas, 1933, 2013) e outra para os demais hábitos investigados. Já em relação à morfoanatomia das folhas, observou-se que havia muitas variações entre as espécies escolhidas para o estudo, representantes das linhagens principais da subtribo. Por esse motivo, novas análises morfoanatômicas, englobando um número maior de espécies, foram conduzidas através da utilização de material herborizado, com a finalidade de investigar se as características já observadas se repetiam nas espécies mais próximas filogeneticamente e se poderiam ser definidas possíveis sinapomorfias através de tais características morfoanatômicas (**Capítulo 5**).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bremer K. 1994.** *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press, Oregon.
- Cuatrecasas J. 1933.** Plantae colombianae novae. *Trabajos del Museo de Ciencias Naturales - Serie Botanica* **33**: 1-158.
- Cuatrecasas J. 2013.** *A Systematic Study of the Subtribe Espeletiinae (Heliantheae, Asteraceae)*. New York, New York Botanical Garden Press.
- DeVore ML, Stuessy TF. 1995.** The place and time of origin of the Asteraceae, with additional comments on the Calyceraceae and Goodeniaceae. In: Hind, D.J.N., Jeffrey, C. E Pope, G.V. (Ed.) *Advances in Compositae systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew 23-40.
- Dickson WC. 2000.** *Integrative Plant Anatomy*. Academic Press, San Diego.
- Fahn A, Cutler DF. 1992.** *Xerophytes*. Encyclopedia of Plant Anatomy, Band 13, Teil 3, Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas NT, Susanna A, Jansen RK. 2005.** Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: Friis, I. e Balslev, H. (Ed.). Plant diversity and complexity patterns – local, regional and global dimensions. Proceedings of an International Symposium. *Biologiske Skrifter* **55**: 343-373.
- Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009.** Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. Systematics, Evolution

and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171-189.

Goertzen LR, Cannone JJ, Gutell RR, Jansen RK. 2003. ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 216-234.

Jansen RK, Palmer JD. 1987. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 5818-5822.

Jeffrey, C. 2007. Introduction with key to tribes. In: Kadereit, J.W e Jeffrey, C. (Ed.), The families and genera of vascular plants, vol 8. Flowering plants-eudicot, Asterales. Springer, Berlin, 61–87.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2007. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. 3 Ed., 508-515.

Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007. A phylogeny of “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (trn L-F, ndh F, ITS). *Molecular phylogenetics and Evolution* **44**: 89-103.

Keeley SC, Robinson H. 2009. Vernonieae. In: Funk, V.A., Susana, A., Stuessy, T.F. e Bayer, R.J. (Ed.). *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT) 439-470.

Keles LC, Melo NI, Aguiar GP, Wakabayashi KAL, Carvalho CE, Cunha WR, Crotti AEM, Lopes JLC, Lopes NP. 2010. Lychnophorinae (asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. *Quimica Nova* **33**: 2245-2260.

Kim KJ, Jansen RK, Wallace RS, Michaels HJ, Palmer JD. 1992. Phylogenetic implications of rbcL sequence variation in the Asteraceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 428-445.

Loeuille BFP. 2011. Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae). Tese submetida ao Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nakajima JN, Dematteis M, Loeuille B, et al. 2013. Asteraceae. In: Martinelli G, Moraes MA, eds. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 203-286.

Panero JL, Funk VA. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the biological society of Washington* **115**: 909-922.

Turner IM. 1994. Sclerophylly - primarily protective? *Functional Ecology* **8**: 669-675.

CAPÍTULO 1

**Histlocalização, fitoquímica e evolução dos metabólitos secundários nas
Lychnophorinae (Vernonieae: Asteraceae)**

Histolocalização, fitoquímica e evolução de metabólitos secundários nas Lychnophorinae (Vernonieae: Asteraceae)

RESUMO

Levando-se em conta que para a subtribo existem poucas evidências sobre as estruturas secretoras responsáveis pela produção dos metabólitos de interesse, esse estudo pretende esclarecer quais são elas; qual a estrutura do tricoma glandular e a sua importância para a manutenção da secreção no órgão. Além disso, através de análises fitoquímicas e da reconstrução dos estados ancestrais dos metabólitos secundários sobre a filogenia de Lychnophorinae busca-se responder: quais são os principais metabólitos secundários presentes nas espécies avaliadas; e se esses metabólitos fornecem informações a respeito da evolução química da subtribo. Nesse estudo são contempladas 15 espécies de Lychnophorinae representantes das principais linhagens da subtribo. Para as análises estruturais e histoquímicas, amostras de caules e de folhas foram processadas de acordo com as técnicas usuais em anatomia vegetal. Para as análises fitoquímicas os extratos foram analisados por cromatografia líquida e espectrometria de massas. Os principais locais de síntese dos metabólitos secundários são: tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos das folhas e dos caules. As análises fitoquímicas evidenciaram a presença de flavonoides, derivados do ácido *trans*-cinâmico, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos. A reconstrução dos estados ancestrais dessas substâncias na filogenia da subtribo e as indicações de possíveis sinapomorfias trazem importantes contribuições para as investigações evolutivas da subtribo.

Palavras-chave: tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos, histoquímica, lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, derivados do ácido *trans*-cinâmico, poliacetilenos.

INTRODUÇÃO

A subtribo Lychnophorinae tem uma distribuição quase restrita ao Brasil, com 18 gêneros e 104 espécies, sendo apenas uma espécie boliviana. As espécies brasileiras se distribuem principalmente nos campos rupestres e cerrados do Planalto Central, compreendendo arbustos, arvoretas e raramente ervas (Loeuille, 2011). Resultados da filogenia molecular e morfológica de Lychnophorinae (Loeuille, 2011) indicam que a subtribo é monofilética. Contudo, ainda restam algumas dúvidas quanto ao posicionamento de alguns táxons e às relações de parentesco na filogenia e, dessa maneira, as espécies da subtribo continuam sendo investigadas em relação à química de metabólitos secundários e à morfoanatomia, buscando-se características que possam ser úteis para um melhor entendimento evolutivo do grupo.

A família Asteraceae inclui grande número de espécies de interesse econômico, muitas delas com grande potencial farmacológico e, por esse motivo, sua morfoanatomia tem sido tradicionalmente investigada, especialmente em relação às estruturas responsáveis pela secreção de substâncias resultantes do metabolismo secundário (Metcalf & Chalk 1950; Carlquist 1959; Lester & Curtis 1985; Castro *et al.* 1997; Ascensão *et al.* 1999; Heinrich *et al.* 2002; Göpfert *et al.* 2005; Appezzato-da-Glória *et al.* 2008; Bartoli *et al.* 2011; Appezzato-da-Glória *et al.* 2012).

Entre os metabólitos secundários presentes em Asteraceae, os terpenoides (mono, sesqui, di e triterpenos e lactonas sesquiterpênicas) e os compostos fenólicos (flavonoides e derivados do ácido cinâmico) são as classes de substâncias mais representativas, sendo considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos, devido a sua enorme variedade

estrutural (Spring, 2000; Heinrich *et al.* 2002; Da Costa *et al.*, 2005; Keles *et al.*, 2010; Yaoita *et al.* 2012; Appezzato-da-Glória *et al.* 2012). Além disso, as lactonas sesquiterpênicas e os acetilenos são considerados classes estruturais únicas que caracterizam Asteraceae (Calabria *et al.*, 2009). A tribo Vernoniae apresenta principalmente flavonoides, diterpenos, poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas e triterpenos, como classes estruturais químicas características (Calabria *et al.*, 2009).

Dentro da subtribo Lychnophorinae diversas espécies têm sido investigadas quimicamente e farmacologicamente, pelo seu potencial anti-helmíntico, antibiótico e antifúngico e pelas propriedades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas que algumas substâncias apresentam (Vichnewski & Gilbert 1972; Vichnewski *et al.* 1976; Oliveira *et al.* 1996; Barth *et al.* 1997; Saúde *et al.* 2002; Souza *et al.* 2008; Silvério *et al.* 2008; Keles *et al.*, 2010). Além da importância terapêutica, os estudos químicos em Lychnophorinae têm ganhado notoriedade no campo da quimiotaxonomia e quimiosistemática, demonstrando ser de grande importância na taxonomia do grupo e, principalmente, na elucidação das investigações evolutivas (Bohlmann *et al.* 1980a,b; Herz *et al.* 1980; Bohlmann *et al.* 1981; Zdero *et al.* 1981; Bohlmann *et al.* 1982; Bohlmann & Jakupovic 1990; Lunardello *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 1996; Vichnewski *et al.* 1999; Sartori *et al.* 2002; Keles *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2012).

A partir de conhecimentos prévios sobre a extração das principais classes de metabólitos da família Asteraceae, especialmente para a subtribo Heliantheae, tem-se considerado os tricomas glandulares como principais locais de síntese e acúmulo dos marcadores quimiotaxonômicos para a família, em especial as lactonas sesquiterpênicas (Spring, 1989; Spring, 1991; Spring, 2001; Da Costa *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.* 2005;

Appezzato-da-Glória *et al.* 2012). A informação sobre a localização dos metabólitos secundários nos órgãos de Lychnophorinae é fundamental para as investigações químicas do grupo, as quais envolvem um grande volume de pesquisas, devido à riqueza química que caracteriza a subtribo (Keles *et al.*, 2010). Todavia, para a subtribo ainda existem poucos estudos (Silva *et al.* 2014) que evidenciem quais são as estruturas responsáveis pela produção dos marcadores quimiotaxonômicos e os locais de ocorrência das mesmas nas espécies do grupo.

Muitas das espécies de Lychnophorinae são endêmicas, com populações pequenas, entre elas, 15 espécies de Lychnophorinae são consideradas raras (Nakajima *et al.* 2009). Devido às condições peculiares dos ambientes em que habitam a maioria das espécies da subtribo (Lusa *et al.* 2014), à sua distribuição restrita e à destruição dos habitats naturais, 46 espécies de Lychnophorinae estão ameaçadas de extinção (Nakajima *et al.*, 2013). Esse dado deve ser levado em consideração quando se pretende coletar material biológico de espécies ameaçadas. Com o advento das modernas técnicas analíticas e espectrométricas para a realização de estudos químicos, a quantidade de material vegetal necessária para permitir a identificação de substâncias tem se tornado cada vez menor (Summer *et al.*, 2003). Quando o foco da investigação é voltado para a detecção de substâncias localizadas em locais especiais (tricomos, órgãos, secreções, etc.), a quantidade requerida é ainda menor, na ordem de poucos gramas a miligramas (Allwood e Goodacre, 2010). Para tanto, é fundamental se conhecer em que estruturas as substâncias de interesse são secretadas ou armazenadas, em que órgão e em que fase de desenvolvimento do órgão se encontram essas substâncias. Desse modo, gera-se um suporte para a coleta seletiva de material, visando a preservação das espécies, incluindo sobretudo aquelas ameaçadas de extinção.

Nesse estudo são contempladas 15 espécies de Lychnophorinae representantes das principais linhagens na filogenia, sobre as quais se investiga a localização e identificação das principais classes de metabólitos secundários nas folhas e caules. Além disso, realizou-se a reconstrução dos estados ancestrais dos metabólitos secundários identificados sobre uma filogenia reduzida de Lychnophorinae, baseada na filogenia previamente estabelecida para a subtribo (Loeuille, 2011). Dessa forma, nessa investigação pretende-se esclarecer: onde os principais marcadores quimiotaxonômicos de Lychnophorinae são secretados e armazenados; em que fase de desenvolvimento do órgão são encontradas essas substâncias; qual a estrutura do tricoma glandular e a sua importância para a manutenção da secreção no órgão; quais os metabólitos secundários principais encontrados nas espécies avaliadas; e se esses metabólitos fornecem informações a respeito da evolução química da subtribo.

MATERIAL E MÉTODOS

O material analisado foi coletado nos Estados de Minas Gerais e Bahia, Brasil (Tabela 1). Exsiccatas foram depositadas no herbário SPF. Nesse estudo foram analisados exclusivamente os órgãos aéreos vegetativos das espécies selecionadas, partindo-se do pressuposto de que as espécies da subtribo apresentam poucas flores nos capítulos (Loeuille, 2011) e, em geral, uma floração anual, o que poderia inviabilizar a utilização das mesmas como fonte de metabólitos secundários. A partir de plantas adultas, foram coletadas amostras de caules (da região apical à mediana dos ramos caulinares) e de folhas jovens e completamente expandidas.

Tabela 1. Ocorrência das espécies.

Espécies	Municípios	Coordenadas geográficas	Altitude	Voucher
<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob.	Grão Mogol, MG	S16°35'37.6'' W42°54'07.7''	673 m	Loeuille <i>et al.</i> 533
<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	Dom Macedo Costa, BA	S12°54'11.1'' W39°12'06.6''	193 m	Loeuille <i>et al.</i> 680
<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.	Santo Antônio do Itambé, MG	S18°23'49.9'' W43°21'21.0''	1819m	Lusa <i>et al.</i> 63
<i>Eremanthus leucodendron</i> Mattf.	Rio de Contas, BA	S13°31'29'' W41°57'39.9''	1691 m	Loeuille <i>et al.</i> 669
<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	Diamantina, MG	S18°11'52.0'' W43°37'33.0''	1141 m	Loeuille <i>et al.</i> 531
<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir.	São Gonçalo do Rio Preto, MG	S18°07'42.1'' W43°22'40.5''	1039m	Lusa <i>et al.</i> 61
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	Diamantina, MG	S18°11'52.5'' W43°37'33.1''	1141 m	Loeuille <i>et al.</i> 530
<i>Lychnophora granmogolensis</i> (Duarte) Semir in D.J.N. Hind	Mucugê, MG	S12°59'52.7'' W41°20'41.2''	924 m	Loeuille <i>et al.</i> 665
<i>Lychnophora santosii</i> (H. Rob.) H. Rob.	Rio de Contas, BA	S13°31'27.8'' W41°57'40.3''	1693 m	Loeuille <i>et al.</i> 668
<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	Diamantina, MG	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	1362 m	Loeuille <i>et al.</i> 528
<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.	Palmeiras, BA	S12°27'25.5'' W41°28'17.3''	1092 m	Loeuille <i>et al.</i> 658
<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.	Diamantina, MG	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	1362 m	Loeuille <i>et al.</i> 529
<i>Paralychnophora bicolor</i> (DC.) MacLeish	Rio de Contas, BA	S13°31'33.7'' W41°57'56.7''	1876 m	Loeuille <i>et al.</i> 672
<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille	Santo Antônio do Itambé, MG	S18°23'53,8'' W43°19'33,0''	1630m	Lusa <i>et al.</i> 62
<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	Santana do Riacho, MG	S19°17'28.1'' W43°36'01.5''	1131 m	Loeuille <i>et al.</i> 524

Caracterização micromorfológica

Para as análises estruturais, as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965, modificada com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), submetidas à bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos, desidratadas em série etílica e infiltradas em resina plástica hidróxi-etil-metacrilato (Leica HistoResin®, Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (Modelo RM 2245, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) com navalha de aço, na espessura de 5-7 µm. Lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (em tampão citrato-fosfato, pH 4,5) (Sakai, 1973) e montadas em resina sintética Entellan® (Merck®, Darmstadt, Germany). Além disso, material fresco de todas as espécies foi seccionado à mão livre com auxílio de lâmina de barbear ou em micrótomo de deslize (Modelo SM 2000R Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany).

Os testes histoquímicos foram eleitos levando-se em consideração os grupos de metabólitos secundários de maior ocorrência em *Lychnophorinae* (Keles *et al.*, 2010) e foram realizados em material fresco e, ou incluído em historesina. Os testes aplicados em material fresco foram realizados logo após as coletas e compreenderam: Sudan IV (Jensen, 1962) e vermelho neutro sob fluorescência (filtro de excitação azul, 'bandpass filter' 450-490) (Kirk, 1970) para substâncias lipofílicas; reagente de NADI (David & Carde, 1964) para terpenoides gerais; ácido sulfúrico (Geissman & Griffin, 1971) para terpenoides do tipo lactonas sesquiterpênicas; cloreto férrico 3% (Johansen, 1940) para compostos fenólicos gerais; e cloreto de alumínio sob fluorescência induzida (filtro de excitação UV, 'bandpass

filter' 340-380) (Charrière-Ladreix, 1976) para compostos fenólicos do tipo flavonoides. As secções foram examinadas imediatamente após cada reação. Foram utilizados dois testes histoquímicos para substâncias lipofílicas, pois ocorreram reações diferentes para o mesmo órgão utilizando os dois testes, provavelmente devido a diferenças na natureza da composição. Para os testes realizados sob fluorescência, as secções foram observadas em luz UV, ao microscópio de Epifluorescência (Modelo DM LB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) equipado com "HBO 100W mercury vapour lamp". Secções controle foram realizadas simultaneamente aos testes histoquímicos, conforme procedimento padrão. Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e secreções, foram montadas e observadas secções sem tratamento.

Em material incluído em historesina foram realizados os testes de cloreto férrico 3% (Johansen, 1940), Sudan IV (Jensen, 1962) e reagente de NADI (David & Carde 1964). A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir das lâminas, utilizando câmera de vídeo (Modelo DC 300F Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, Switzerland) acoplada ao Microscópio anteriormente citado.

Análise fitoquímica e preparo dos extratos

Os grupos de metabólitos secundários tradicionalmente considerados de importância quimiotaxonômica em Lychnophorinae (Keles *et al.* 2010), principalmente flavonoides e lactonas sesquiterpênicas, apresentam de média a alta polaridade, sendo extraídos com solventes orgânicos, principalmente de folhas e caules aéreos. Para a identificação dessas substâncias, foram amostrados caules (ramos ou eixos caulinares) e folhas (jovens e adultas) de três indivíduos sadios de cada local de coleta (Tabela 1). As amostras do material

botânico foram secas em estufa de ar circulante a 35 °C, durante sete dias, e armazenadas em sacos plásticos vedados, contendo sílica-gel, ao abrigo da luz.

Levando em conta a polaridade das substâncias de interesse, foram preparados extratos de lavagens de folhas e de caules que continham tricomas glandulares, com objetivo de se isolar substâncias secretadas pelos mesmos, ou seja, não foram realizadas lavagens nos caules das espécies caulirosuladas *Minasia scapigera* e *Prestelia eriopus*, pois esses não apresentam tricomas glandulares (ver Capítulo 5 desta Tese). Além disso, foram preparados extratos totais de caules e de folhas (ambos pulverizados) para a possível detecção de substâncias presentes também nas porções internas desses órgãos.

Para a obtenção dos extratos de lavagem foram utilizados ramos caulinares e folhas íntegros. Em um recipiente contendo o material vegetal foi adicionada acetona, em quantidade suficiente para cobrir o material, e foi mantida a agitação manual por 15 segundos. A seguir o extrato obtido foi filtrado em papel filtro, levado ao rotaevaporador (Votavapor R-210, BUCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) para concentrá-lo, transferido a um novo frasco e levado para secar em ar comprimido. Então, foi adicionado ao extrato seco 1 mL de etanol-água 7:3 (v/v, grau HPLC) e o frasco foi levado ao agitador de tubos (AP56, Phoenix, Araraquara, Brasil) e ao ultrassom (Maxiclean 1600, Unique, Indaiatuba, Brasil) até a dissolução completa do material. Em seguida, os extratos foram particionados com *n*-hexano (grau HPLC) para remoção do material graxo (ceras, pigmentos lipofílicos, entre outros), filtrados em filtro de PTFE de 0,20 µm de diâmetro de poro e levados para secagem a 45 °C por três horas (Speed Vac Concentrator, Modelo Savant SPD 2010-220, Thermo Electron Corporation, Milford, USA). Em seguida o extrato seco foi pesado e diluído no volume exato para atingir a concentração 1 mg/mL.

Os extratos totais foram obtidos a partir das folhas e dos caules secos previamente pulverizados em almofariz, pistilo e nitrogênio líquido. A extração do material vegetal pulverizado foi realizada utilizando-se etanol-água 7:3 (v/v, grau HPLC) por maceração durante 20 minutos no ultrassom. Para cada amostra foram pesados 20 mg de pó, o qual foi extraído com a solução extratora até completar o volume de 2 ml. Todos os extratos foram particionados com *n*-hexano (grau HPLC) para remover o material graxo, filtrados em filtro de PTFE de 0,20 µm de diâmetro de poro e em seguida analisados por UHPLC-UV-MS (Thermo Fisher Scientific, EUA), juntamente com os extratos de lavagem.

Análises por UHPLC-UV-MS

As análises foram realizadas em um UHPLC Accela™ (Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplado a um detector de UV com arranjo de diodos (UV-DAD) e a um espectrômetro de massas Exactive Plus™ (Thermo Fisher Scientific, EUA) com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo Orbitrap.

Para a análise dos extratos, foi injetada uma alíquota de 5 µL via auto-injetor, mantido à temperatura de 10 °C. A separação cromatográfica foi feita em coluna ACE C-18 (150 x 3,0 mm de tamanho e 3 µM de diâmetro de partícula), protegida por uma pré-coluna de material equivalente. O fluxo da fase móvel foi de 0,4 mL/min, contendo água com ácido fórmico a 0,1% (v/v) na bomba A, e acetonitrila na bomba B, de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 0 – 17 min, 2 – 55% B; 17 – 20 min, 55 - 100% B; 20 – 24 min, 100% B; 24 – 27 min, 100 - 2% B; 27 – 30 min, 2% B. Os cromatogramas no UV foram registrados nos comprimentos de onda de 254, 270 e 330 nm. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de 150 m/z (massa/carga) a 1200 m/z nos modos positivo e negativo de

ionização e os parâmetros a seguir foram mantidos em todas as análises: 6,5 scans por segundo; intervalo entre os espectros de 1 μ s, resolução de 70000 e temperatura do capilar de 300 °C.

Identificação dos picos cromatográficos

Os extratos foram analisados por UHPLC-UV-MS nos modos positivo e negativo de ionização. Inicialmente, a identificação dos picos cromatográficos foi feita com base nos espectros de absorção no UV, usados para sugerir as classes dos metabólitos secundários, e em seguida, a medida de massa acurada (usada para calcular as possíveis fórmulas moleculares), obtida a partir dos íons moleculares ($[M+H]^+$ e $[M-H]^-$). As fórmulas moleculares foram usadas como ferramenta de busca nos bancos de dados (Scifinder e Dictionary of Natural Products). Além disso, identificação dos picos cromatográficos também foi baseada nos dados presentes na literatura de substâncias previamente identificadas na subtribo Lychnophorinae e, principalmente, nos gêneros e espécies analisados.

Codificação dos caracteres e reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres na filogenia

Nesse estudo utilizou-se a árvore filogenética de consenso estrito de 44 árvores igualmente parcimoniosas resultante da análise combinada de dados moleculares (ITS, ETS, *ndhF* e *rpl32-trnL*) e morfológicos realizada por Loeuille (2011). No entanto, foram utilizadas como terminais na árvore, exclusivamente as espécies analisadas em relação à histoquímica e fitoquímica, totalizando 15 terminais, os quais representam as principais

linhagens da subtribo. De acordo com a hipótese filogenética utilizada nesse estudo (Loeuille, 2011), os gêneros na sua maioria são monofiléticos, com exceção de *Eremanthus* e *Lychnophora*. No presente estudo o clado *Eremanthus* sensu stricto (s. str.) é representado por *Eremanthus polycephalus*. *E. leucodendron* pertence ao clado 'Bahian *Lychnophora*' da filogenia mais recente (Loeuille, 2011). O clado *Lychnophora* sensu stricto (s. str.) é representado por *L. diamantinana* e *L. granmogolensis*. Além disso, o gênero *Lychnophora* apresenta terminais externos ao clado *Lychnophora* s. str. nas linhagens: Aliança *Prestelia* (*L. tomentosa*) e 'Bahian *Lychnophora*' (*L. santosii* + *L. triflora*). Para a reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foram combinadas as informações químicas com a hipótese filogenética de Lychnophorinae através de reconstruções em parcimônia. A análise em parcimônia foi implementada no programa Mesquite 2.74 (Maddison e Maddison, 2007). Nos nós com ambiguidade foram geradas todas as 'reconstruções mais parcimoniosas' ('most parsimonious reconstructions' - MPRs).

RESULTADOS

Histoquímica e identificação das fases de secreção nas folhas e caules

Os testes histoquímicos revelaram que os metabólitos secundários referentes aos principais marcadores quimiotaxonômicos de Lychnophorinae são secretados e acumulados em estruturas secretoras típicas como tricomas glandulares e idioblastos epidérmicos (Fig. 1A- L) e em tecidos secretores, tais como: parênquima clorofiliano paliçádico e lacunoso, parênquima fundamental da nervura central nas folhas (Fig. 1H, K, M-O); parênquima cortical e medular, parênquima floemático e endoderme secretora nos caules (Fig. 1P-S).

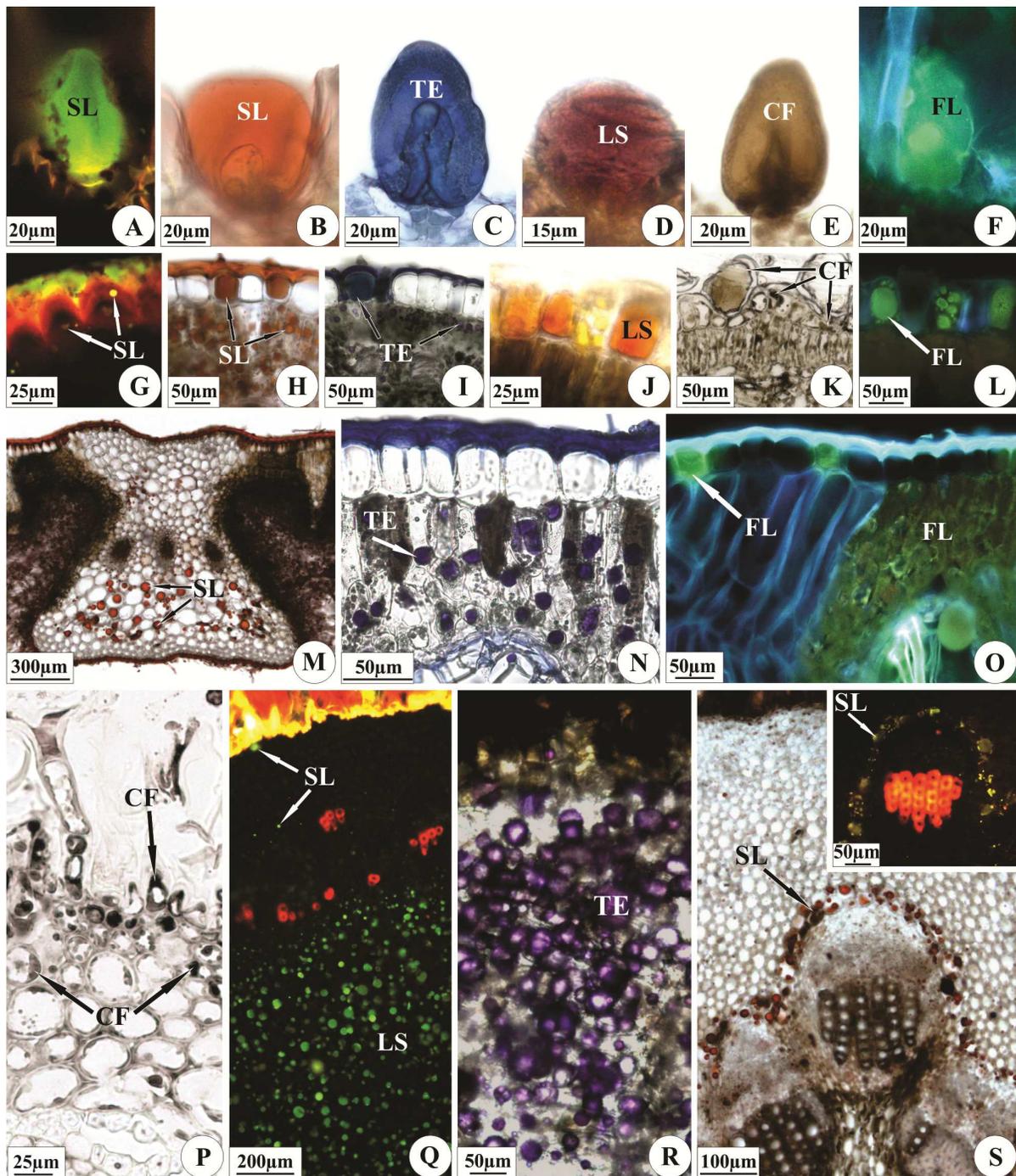


Figura 1. Reações histoquímicas em secções transversais das folhas e dos caules de espécies de Lychnophorinae. A, F, G, L, N, O, Q, S - Microscopia de fluorescência. B-E, H-K, M, P, R - Microscopia de luz. A, F, S. *Anteremanthus hatschbachii*; B, L. *Lychnophora santosii*; D, N. *Chronopappus bifrons*; C, E, J., M. *L. diamantinana*; G. *L. granmogolensis*; H, O, R. *Prestelia eriopus*; I. *L. triflora*; K, P. *Eremanthus polycephalus*. Q. *Piptolepis monticola*. A-

F. Tricomas glandulares. G-L. Idioblastos epidérmicos das folhas. M. Nervura central com acúmulo de metabólitos no parênquima fundamental. H, K, N-O. Acúmulo de metabólitos no parênquima clorofiliano do mesófilo e, ou na epiderme. P. Detalhe da epiderme e parênquima cortical caulinar com secreção. Q. Córtex e medula caulinar apresentando secreção. R. Detalhe do floema secundário do caule, com secreção nas células parenquimáticas. S. Endoderme secretora no caule; inset = detalhe da estrutura. As figuras ilustram reações positivas para: substâncias lipofílicas (SL), evidenciadas pelo vermelho neutro (A, G, Q, S) em verde fluorescente e pelo Sudan IV (B, H, M, S) em laranja a vermelho; terpenoides gerais (TE), indicados pelo NADI (C, I, N, R) em azul a roxo; lactonas sesquiterpênicas (LS), evidenciadas pelo ácido sulfúrico (D, J) em vermelho a laranja e amarelo; compostos fenólicos (CF) evidenciados pelo cloreto férrico (E, K, P) em marrom a preto; e flavonoides (FL) indicados pelo cloreto de alumínio (F, L, O) em verde.

As Tabelas 2 e 3 indicam os testes histoquímicos realizados em folhas e caules, as classes de substâncias encontradas e os locais de secreção nas espécies avaliadas. De um modo geral, as substâncias lipofílicas estão relacionadas à ocorrência de terpenoides, ou seja, as regiões nos órgãos com reações positivas para substâncias lipofílicas predominantemente apresentam reações positivas para terpenoides gerais.

Tabela 2. Testes histoquímicos e as respectivas classes metabólicas sugeridas para as secreções nas folhas de espécies de Lychnophorinae.

Espécies	Testes	Sudan IV	Vermelho neutro	Reagente de Nadi	Ácido Sulfúrico	Cloreto	Cloreto de Alumínio
	histoquímicos					Férrico	
	Classes metabólicas	Substâncias lipofílicas	Substâncias lipofílicas	Terpenoides gerais	Lactonas sesquiterpênicas	Compostos fenólicos	Flavonoides
<i>Antheremanthus hatschbachii</i>		CL, NC	TG, CL, NC	CL, NC	TG	TG, CL, NC	TG, CL, NC
<i>Blanchetia heterotricha</i>		TG, NC	TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG	TG, IE, CL	TG, IE, CL
<i>Chronopappus bifrons</i>		CL, NC	TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG, IE	TG, IE, CL,	TG, IE, CL, NC
<i>Eremanthus polycephalus</i>		TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG	TG, IE, CL,	TG, NC
<i>Eremanthus leucodendron</i>		-	TG, NC	NC	TG	CL	CL
<i>Heterocoma gracilis</i>		CL, NC	TG, CL, NC	CL, NC	TG	TG, IE, CL,	TG, IE, CL NC
<i>Lychnophora diamantinana</i>		TG, IE, CL, NC	TG, CL, NC	TG, IE, CL, NC	TG, IE	TG, IE, CL	TG, IE, CL
<i>Lychnophora granmogolensis</i>		CL, NC	TG, IE, CL, NC	IE, CL, NC	TG, IE	IE, CL	IE, CL
<i>Lychnophora santosii</i>		TG, CL, NC	TG, IE, CL, NC	TG, IE, CL, NC	TG	TG, IE	TG, IE
<i>Lychnophora tomentosa</i>		CL	CL, NC	CL, NC	-	TG, IE, CL,	IE, CL, NC
<i>Lychnophora triflora</i>		CL, NC	TG, CL, NC	TG, IE, CL, NC	IE	TG, IE, CL	IE, CL
<i>Minasia scapigera</i>		NC	NC	NC	TG	TG, CL	CL
<i>Paralychnophora bicolor</i>		TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG, CL, NC	-	IE, CL, NC	IE, CL, NC
<i>Piptolepis monticola</i>		CL, NC	TG, CL, NC	TG, CL, NC	TG	TG, IE, CL,	TG, IE, CL NC
<i>Prestelia eriopus</i>		IE, CL, NC	TG, CL, NC	TG, CL	-	TG, IE, CL	TG, IE, CL

Abreviações: CL = clorênquima; IE = idioblasto epidérmico; NC = nervura central; TG = tricoma glandular; "-" = negativo.

Tabela 3. Testes histoquímicos e as respectivas classes metabólicas sugeridas para as secreções nos caules de espécies de Lychnophorinae.

Espécies	Testes histoquímicos	Sudan IV	Vermelho neutro	Reagente de Nadi	Ácido Sulfúrico	Cloreto Férrico	Cloreto de Alumínio
	Classes metabólicas	Substâncias lipofílicas	Substâncias lipofílicas	Terpenoides gerais	Lactonas sesquiterpênicas	Compostos fenólicos	Flavonoides
<i>Antheremanthus hatschbachii</i>		EN	TG, EN	EN	TG	TG	TG
<i>Blanchetia heterotricha</i>		PC, PM	TG, PC, PM	PC, PM	TG	TG, IE, PC	TG, PC
<i>Chronopappus bifrons</i>		PC, PF, PM	PC, PF, PM	PC, PF, PM	-	PC	PC
<i>Eremanthus polycephalus</i>		EN, PM	TG, EN, PM	TG, EN, PM	TG	TG, IE, PC, PF	TG, PC, PF
<i>Eremanthus leucodendron</i>		-	TG, PC, PM	PC, PM	TG	IE, PC	PC
<i>Heterocoma gracilis</i>		PC, PF, PM	PC, PF, PM	PC, PF, PM	IE, PF	IE, PC, PF	PC, PF
<i>Lychnophora diamantinana</i>		TG	TG	TG	TG	TG, IE, PC, PF	TG, PC, PF
<i>Lychnophora granmogolensis</i>		TG, PC	TG, PC, PM	TG, PC, PM	TG	IE, PC, PF	PC, PF
<i>Lychnophora santosii</i>		PC, PF, PM	TG, PC, PF, PM	PC, PF, PM	TG	TG, IE, PC, PF	TG, PC
<i>Lychnophora tomentosa</i>		-	PC	PC	-	-	-
<i>Lychnophora triflora</i>		PF, PM	PF, PM	PM	-	TG, IE, PC, PM	PC, PM
<i>Minasia scapigera</i>		PF, PM	PF, PM	PF, PM	-	-	-
<i>Paralychnophora bicolor</i>		PC, PF, PM	PC, PF, PM	TG, IE, PC, PF, PM	IE	TG, IE, PC, PF,	PC, PF, PM
<i>Piptolepis monticola</i>		TG, PC, PF, PM	TG, PC, PF, PM	PC, PF, PM	TG	TG, IE, PC, PF,	TG, PC, PF, PM
<i>Prestelia eriopus</i>		PF, PM	PF, PM	PF, PM	-	-	-

Abreviações: EN = endoderme; IE = idioblasto epidérmico; PC = parênquima cortical; PF = parênquima floemático; PM = parênquima medular; TG = tricoma glandular; "-" = negativo.

A presença de metabólitos varia entre folhas jovens e completamente expandidas e entre as porções apical e mediana dos ramos caulinares. Dentre as espécies avaliadas, observou-se que todas elas apresentam as mesmas estruturas secretoras e classes metabólicas em folhas jovens e completamente expandidas. Contudo, a densidade de tricomas glandulares com secreção é visivelmente maior nas folhas jovens da maioria das espécies (Fig. 2A). Em *Blanchetia heterotricha*, *Eremanthus polycephalus*, *Lychnophora diamantinana* e *L. santosii* as folhas completamente expandidas também apresentam abundantes tricomas glandulares com secreção (Fig. 2C-D). Nos demais locais de secreção (idiobastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos), o acúmulo de metabólitos é equivalente em órgãos jovens e adultos.

Em relação ao caule, as espécies apresentam tricomas glandulares com secreção nas porções mais apicais dos ramos caulinares (Fig. 2E-F), com exceção de *Minasia scapigera* e *Prestelia eriopus*, que apresentam caule congesto com espessamento secundário a partir do ápice e, dessa maneira, não apresentam tricomas glandulares no caule. Nas demais espécies, durante o espessamento secundário dos ramos, a epiderme com tricomas glandulares é substituída pelo revestimento secundário e, em decorrência dessa mudança, os terpenoides gerais, lactonas sesquiterpênicas e flavonoides restritos aos tricomas glandulares e, ou às células epidérmicas deixam de ocorrer nas porções medianas dos ramos.

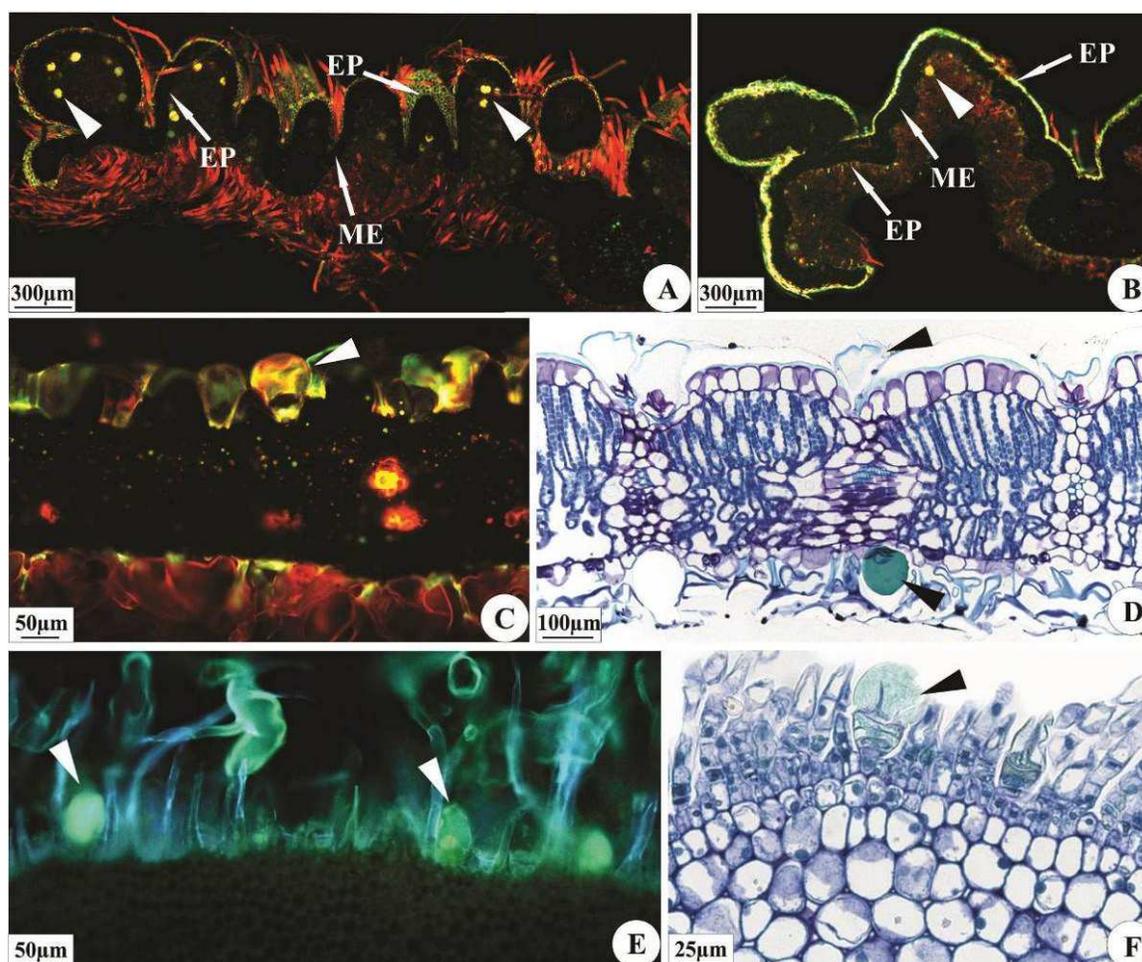


Figura 2. Fases de secreção associadas à presença de metabólitos nos tricomas glandulares de folhas e caules das espécies de Lychnophorinae. A-C e E. Microscopia de fluorescência (A-C. Reações com vermelho neutro; E. Reação com cloreto de alumínio). D e F. Microscopia de luz (coloração com azul de toluidina). A e B. Folhas onduladas, jovem (A) e completamente expandida (B) de *Chronopappus bifrons*. Notar número visualmente maior de tricomas com secreção na folha jovem. C. Folha completamente expandida de *Lychnophora santosii* com tricomas glandulares na face adaxial. D. Folha completamente expandida de *Eremanthus polycephalus* com tricoma glandular capitado apresentando secreção na face abaxial. E e F. Superfície da porção apical dos caules de *Anteremanthus hatschbachii* e *L. diamantinana* com tricomas glandulares, respectivamente. EP = epiderme; ME = mesofilo; cabeças de seta = tricoma glandular.

Estrutura dos tricomas glandulares

Os tricomas glandulares presentes em folhas e ramos caulinares de Lychnophorinae são capitados, bisseriados, com pedúnculo curto formado por um par de células basais e número variável de células secretoras (Fig. 3A), de quatro a sete pares.

A ontogênese dos tricomas glandulares foi realizada para todas as espécies. O processo é semelhante para todas elas, sendo ilustrado nesse trabalho apenas para *Prestelia eriopus*. Verificou-se que o desenvolvimento dos tricomas glandulares não é sincrônico, ou seja, há tricomas em diferentes fases posicionados lado a lado (Fig. 3B). Esse processo inicia-se nos primórdios foliares (Fig. 3C e 3D) e no eixo das gemas caulinares e se encerra em folhas jovens (Fig. 3E) e nas porções apicais dos ramos caulinares, onde não são mais observados os tecidos meristemáticos. As folhas completamente expandidas e as porções medianas dos ramos caulinares podem apresentar tricomas com secreção, mas nunca tricomas em diferenciação, enquanto as folhas senescentes e as porções basais e espessadas do caule já não apresentam tricomas glandulares.

No início do desenvolvimento dos tricomas glandulares, uma célula protodérmica, com núcleo evidente e citoplasma denso, se alonga anticlinalmente até sua extremidade apical adquirir forma capitada (Fig. 3F-H). A primeira divisão é anticlinal (Fig. 3I) e esta é seguida por outra periclinal, originando quatro células (Fig. 3J). As duas células da base se diferenciarão no par de células do pedúnculo e as duas células apicais dividem-se periclinalmente gerando quatro a sete pares de células secretoras (Fig. 3K-N). No momento da secreção a parede periclinal externa do último par de células se retrai (Fig. 3N-O). A cutícula se distende (Fig. 3O) formando o espaço subcuticular onde será depositada a

secreção (Fig. 3P-Q) até que haja o rompimento para a liberação dessa secreção. De modo geral, a cutícula é pouco espessa (Fig. 3O) e rompe-se com facilidade.

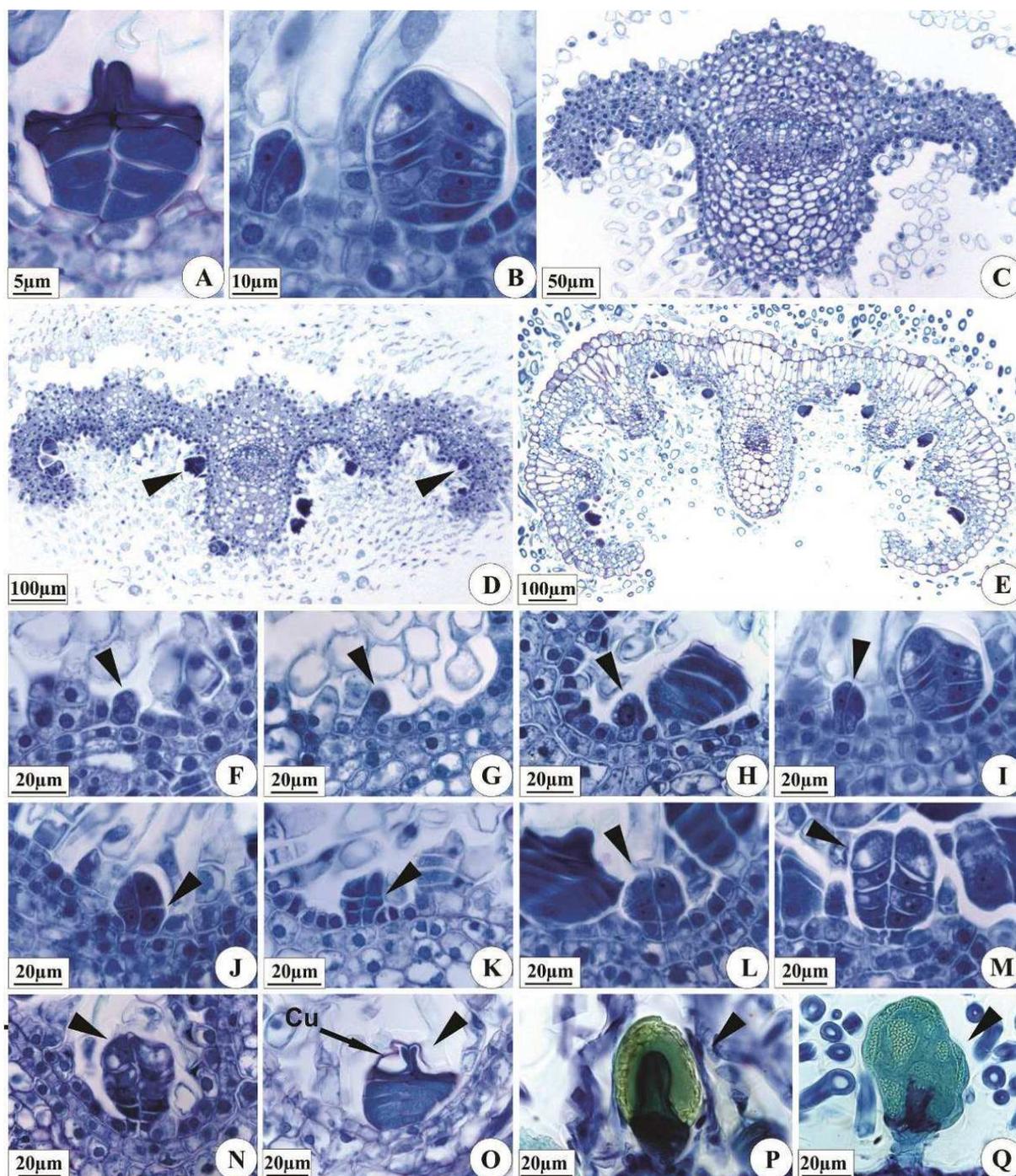


Figura 3. Caracterização e desenvolvimento do tricoma glandular capitado das espécies de Lychnophorinae (cabeças de seta). A-B, F-O. Tricomas glandulares de *Prestelia eriopus*. C-E. Secções transversais da folha de *P. eriopus*. P e Q. Tricomas glandulares de *Lychnophora diamantinana*. A. Estrutura do tricoma glandular apresentando pedúnculo e células secretoras. B. Tricomas em diferentes fases de desenvolvimento. C. Primórdio foliar. D. Primórdio foliar com tricomas (cabeças de seta) jovens e desenvolvidos. E. Folha jovem. F-N. Ontogênese dos tricomas glandulares (cabeças de seta). O. Tricoma glandular com cutícula se distendendo. P-Q. Tricoma glandular com secreção no espaço subcuticular, com células secretoras íntegras no início da fase secretora (P) e com as células secretoras degeneradas, no final do processo de secreção (Q).

Desta forma, para a maioria das espécies analisadas apenas uma pequena parte dos tricomas glandulares permanece com a secreção armazenada até a fase em que a folha se encontra completamente expandida (2B) e nas porções subapicais dos ramos caulinares. Entretanto, nos tricomas glandulares de *Blanchetia heterotricha*, *Lychnophora santosii* (Fig. 2C), *Eremanthus polycephalus* (Fig. 2D) e *Lychnophora diamantinana* (Fig. 3P-Q), a cutícula não se rompe facilmente e a secreção dos tricomas se mantém nas folhas completamente expandidas, mesmo após a degradação das células secretoras do tricoma (Fig. 3Q).

Caracterização fitoquímica

As análises fitoquímicas das folhas e caules aéreos das espécies de Lychnophorinae por UHPLC-UV-MS focando as substâncias de alta e média polaridade indicaram a presença de compostos fenólicos (40 flavonoides e 14 ácidos fenólicos derivados do ácido *trans*-cinâmico), terpenoides (35 lactonas sesquiterpênicas), poliacetilenos (nove substâncias) e

quatro substâncias cujas classes não foram identificadas (Tabela 4). Os poliacetilenos foram encontrados apenas nos extratos totais de caules. As demais substâncias foram encontradas em caules e/ou em folhas, podendo ser identificadas exclusivamente nos extratos de lavagens, nos extratos totais ou em ambos (Tabela 5).

Tabela 4. Substâncias identificadas nos extratos foliares e caulinares por UHPLC-UV-MS.

	Substância provável	Classe química	Tipo de substância	Tipo do extrato
1	15-desoxigoyazensolido	LST ¹	Furanoeliangolido	TF ² , TC ³ , LF ⁴ , LC ⁵
2	15-hidroxi-16 α -1'-metilprop-1'-Z-enil)eremantolido	LST	Eremantolido	TF, TC, LF, LC
3	15-hidroxieremantolido B	LST	Eremantolido	TF, TC, LF, LC
4	16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)eremantolido	LST	Eremantolido	TF, TC, LF, LC
5	3,7-dimetoxi-5, 3', 4'-triidroxiflavona	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LF, LC
6	3',4'-dimetoxiluteolina	Flavonoide	Flavona	LF
7	3-O-(6''-O-E-p-cumaoroil)- β -glucupiranosilisorhamnetina	Flavonoide	Flavonol	TF, TC, LC
8	3-O-acetilpinobanksina	Flavonoide	Flavonol	TC, LF, LC
9	3-O-metilquercetina	Flavonoide	Flavonol	LF, LC
10	4,5-diidro-16 α -(1'-metilprop-1'-Z-enil)eremantolido	LST	Eremantolido	LF
11	4,5-diidroeremantolido C	LST	Eremantolido	TF, LF, LC
12	5-hidroxi-4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	LST	Furanoeliangolido	TF, TC, LF, LC
13	acacetina	Flavonoide	Flavona	LF
14	ácido diferuloilquínico	DAC ⁶	Ácido feruloilquínico	TC
15	ácido-3,4-di-O-(E)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
16	ácido-3,5-di-O-(E)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
17	ácido-3-O-(E)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC
18	ácido-4,5-di-O-(E)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
19	ácido-4-O-(E)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
20	ácido-4-O-(E)-feruloilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF

21	ácido-5-O-(<i>E</i>)-cafeoilquínico	DAC	Ácido cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
22	ácido-cafeoilferuloilquínico	DAC	Ácido feroluil- cafeoilquínico	TF, TC, LF, LC
23	apigenina	Flavonoide	Flavona	TF, LF, LC
24	centraterina	LST	Furanoeliangolido	TF, TC, LF, LC
25	chrisoeriol	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LF, LC
26	derivado do ácido cinâmico 1 (n.i.)	DAC	-	TF
27	derivado do ácido cinâmico 2 (n.i.)	DAC	-	TF
28	derivado do ácido cinâmico 3 (n.i.)	DAC	-	LF
29	derivado do ácido cinâmico 4 (n.i.)	DAC	-	LF
30	derivado do ácido cinâmico 5 (n.i.)	DAC	-	TC
31	eremantolido A	LST	Eremantolido	TF, LF, LC
32	eremantolido C	LST	Eremantolido	TF, LF, LC
33	ermanina	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LF, LC
34	flavonoide 1 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
35	flavonoide 10 (n.i.)	Flavonoide	-	LF, LC
36	flavonoide 11 (n.i.)	Flavonoide	-	LF
37	flavonoide 12 (n.i.)	Flavonoide	-	LF, LC
38	flavonoide 13 (n.i.)	Flavonoide	-	TC
39	flavonoide 14 (n.i.)	Flavonoide	-	TC
40	flavonoide 15 (n.i.)	Flavonoide	-	LC
41	flavonoide 16 (n.i.)	Flavonoide	-	LC
42	flavonoide 2 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
43	flavonoide 3 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
44	flavonoide 4 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
45	flavonoide 5 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
46	flavonoide 6 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
47	flavonoide 7 (n.i.)	Flavonoide	-	TF, LF
48	flavonoide 8 (n.i.)	Flavonoide	-	TF
49	flavonoide 9 (n.i.)	Flavonoide	-	TF, LF, LC
50	galangina-3-O-metil	Flavonoide	Flavonol	TF, LF, LC
51	goyazensolido	LST	Furanoeliangolido	TF, LF
52	isorientina	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LC
53	isoquercetrina	Flavonoide	Flavonol	TF, TC
54	isorhamnetina	Flavonoide	Flavonol	TF, LF, LC
55	camferol	Flavonoide	Flavonol	TF, LF, LC
56	camferol-3- <i>O</i> -hexose- <i>O</i> -cafeoil-rhamnosideo	Flavonoide	Flavonol	TF, TC
57	LST 1 (n.i.)	LST	-	TF, LF
58	LST 10 (n.i.)	LST	-	LF

59	LST 11 (n.i.)	LST	-	LF
60	LST 12 (n.i.)	LST	-	LF, LC
61	LST 13 (n.i.)	LST	-	LF
62	LST 14 (n.i.)	LST	-	LF
63	LST 15 (n.i.)	LST	-	LF
64	LST 16 (n.i.)	LST	-	LF
65	LST 17 (n.i.)	LST	-	TC
66	LST 18 (n.i.)	LST	-	TC
67	LST 19 (n.i.)	LST	-	TC
68	LST 20 (n.i.)	LST	-	TC
69	LST 21 (n.i.)	LST	-	LC
70	LST 22 (n.i.)	LST	-	LC
71	LST 23 (n.i.)	LST	-	LC
72	LST 2 (n.i.)	LST	-	TF
73	LST 3 (n.i.)	LST	-	TF, LF
74	LST 4 (n.i.)	LST	-	TF
75	LST 5 (n.i.)	LST	-	TF, LF, LC
76	LST 6 (n.i.)	LST	-	TF
77	LST 7 (n.i.)	LST	-	LF, LC
78	LST 8 (n.i.)	LST	-	LF
79	LST 9 (n.i.)	LST	-	LF
80	lucenin-2 (6,8-di-C- β -glicopiranosilluteolina)	Flavonoide	Flavona	TF, TC
81	luteolina	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LF, LC
82	luteolina-7-O-glicuronil	Flavonoide	Flavona	TF
83	lychnopholido	LST	Furanoeliangolido	TF, LF, LC
84	não identificado 1	-	-	TF
85	não identificado 2	-	-	TF
86	não identificado 3	-	-	LF
87	não identificado 4	-	-	LC
88	orientina	Flavonoide	Flavona	TF, TC
89	pinobanksina	Flavonoide	Flavonol	TF, TC, LF, LC
90	pinostrobina	Flavonoide	Flavonol	LF
91	poliacetileno 1 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
92	poliacetileno 2 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
93	poliacetileno 3 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
94	poliacetileno 4 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
95	poliacetileno 5 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
96	poliacetileno 6 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
97	poliacetileno 7 (n.i.)	poliacetileno	-	TC
98	poliacetileno 8 (n.i.)	poliacetileno	-	TC

99	poliacetileno 9 (não ident)	poliacetileno	-	TC
100	quercetin-3- <i>O</i> -dipentosideo	Flavonoide	Flavonol	TF, TC
101	quercetina	Flavonoide	Flavonol	LF, LC
102	tilirosideo	Flavonoide	Flavonol	TF, TC, LF, LC
103	vicenina-2 (6,8-di- <i>C</i> - β -glicopiranosilapigenina)	Flavonoide	Flavona	TF, TC, LC

Abreviações: ¹LST = Lactonas sesquiterpênicas, TF²= Extrato total das folhas, TC³= Extrato total dos caules, LF⁴ = Extrato de lavagem das folhas, LC⁵= Extrato de lavagem dos caules, ⁶DAC = Derivados do ácido cinâmico. n.i.⁷= não identificado.

Tabela 5. Ocorrência dos metabólitos secundários de acordo com os extratos e órgãos onde foram obtidos.

Classes químicas	Extrato Total			Extrato de Lavagem			Ambos os extratos		
	Folha	Caule	Folha e Caule	Folha	Caule	Folha e Caule	Folha	Caule	Folha e Caule
Flavonoides	12	2	5	5	7	4	6	5	6
DAC	2	3	1	2	-	-	1	-	6
LST	3	4	-	10	7	2	7	-	6
Poliacetilenos	-	9	-	-	-	-	-	-	-

Os números indicam quantas substâncias foram identificadas exclusivamente nos extratos e nos órgãos (analisados isoladamente ou em conjunto). Abreviações: LST = lactonas sesquiterpênicas, DAC = derivados do ácido cinâmico.

Reconstrução dos estados ancestrais dos metabólitos secundários na filogenia

A reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres dos metabólitos secundários nas folhas e nos caules está representada nas figuras 4 a 6 e 7 a 10, respectivamente.

Em relação às folhas, todas as espécies investigadas apresentaram flavonoides (Fig. 4, Tabela 4). As substâncias 80 (lucenina-2) e 100 (quercetina-3-*O*-dipentose) possuem duas hipóteses para o seu surgimento: na PMR1, o estado teria surgido uma única vez para os clados mais "derivados" *Piptolepis monticola* + *Eremanthus polycephalus* + *Lychnophora* s. str., com posterior perda em *Lychnophora* s. str. (Fig. 4). Nesse caso, ambas as substâncias seriam possíveis sinapomorfias. Na PMR2, o estado teria surgido duas vezes independentemente, uma em *Piptolepis monticola* e outra em *Eremanthus polycephalus*.

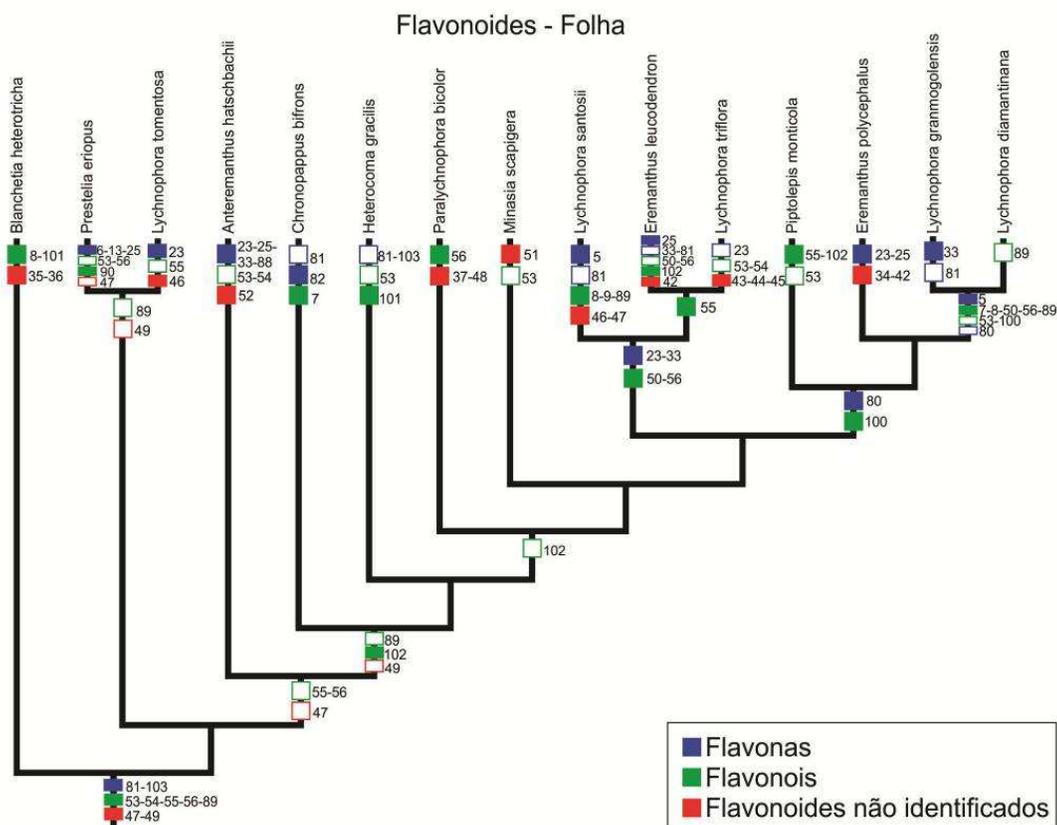


Figura 4. Reconstrução dos estados ancestrais dos flavonoides presentes nas folhas (em

parcimônia). Quadro cheio = aquisição do caracter. Quadro vazio = perda do caracter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

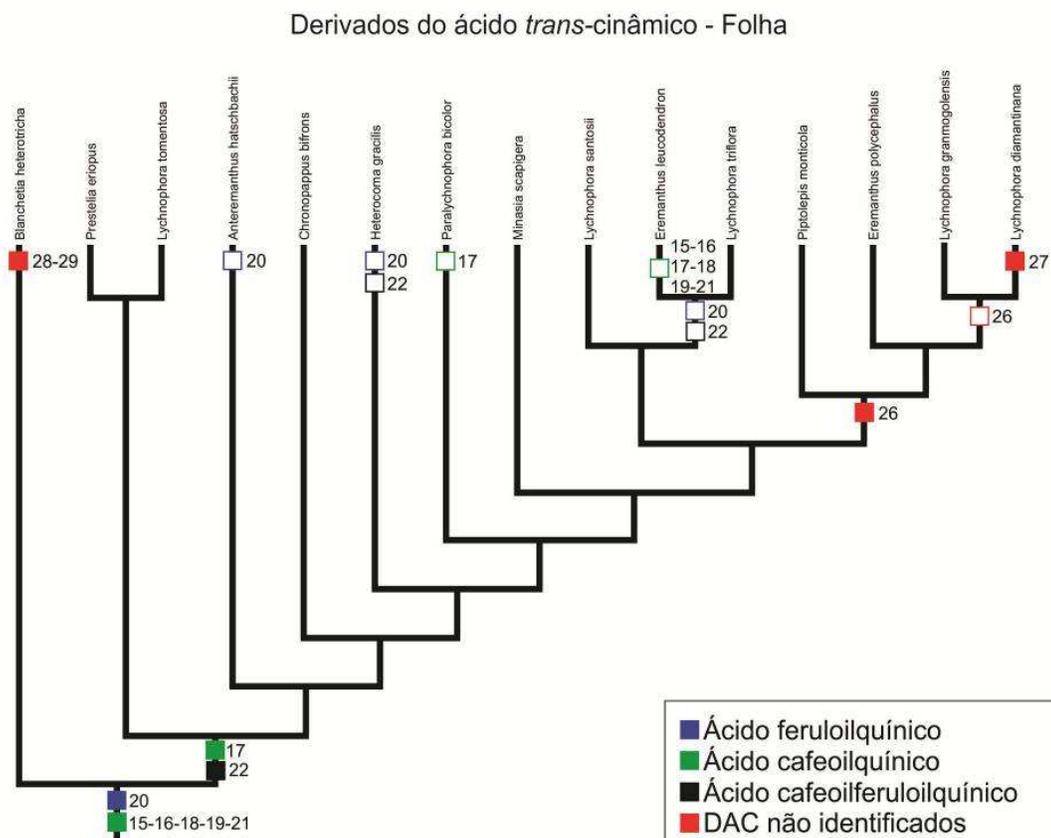


Figura 5. Reconstrução dos estados ancestrais dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (DAC) presentes nas folhas (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do caracter. Quadro vazio = perda do caracter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

O mapeamento dos metabólitos secundários indicou a presença de cinco lactonas sesquiterpênicas na folha como possíveis sinapomorfias (Fig. 6, Tabela 4). A substância 1 (15-desoxigoyzensolido) apresenta mais de uma hipótese de surgimento: na PPR1, o estado teria surgido uma única vez (possível sinapomorfia) no ancestral do clado *Minasia scapigera* + "Bahian" *Lychnophora* (*Lychnophora santosii* + *L. triflora* + *Eremanthus leucodendron*),

com perda para *L. triflora* e para o ancestral dos clados mais "derivados" (Fig. 6); na MPR2, o estado teria surgido independentemente nos ancestrais de *Minasia scapigera* e do clado "Bahian" *Lychnophora*, com perda em *L. triflora*; finalmente, na MPR3, o estado da presença da substância 1 poderia ter sido adquirido três vezes independentemente em *Minasia scapigera*, *L. santosii* e *Eremanthus leucodendron*.

A substância 3 (15-hidroxieremantolido B) é uma provável sinapomorfia para as linhagens mais derivadas *Piptolepis monticola*, *Eremanthus polycephalus* e *Lychnophora* s. str., com uma única perda em *L. granmogolensis*. A substância 11 (4,5-diidroeremantolido C) apresenta mais de uma hipótese de surgimento: na primeira (MPR1), hipótese de sinapomorfia, o estado teria sido adquirido uma única vez no ancestral de *Heterocoma gracilis* + *Paralychnophora bicolor*, com reversão para as linhagens a partir do ancestral de *Minasia scapigera* (Fig. 6); na MPR2, o estado teria surgido duas vezes independentemente nas espécies citadas.

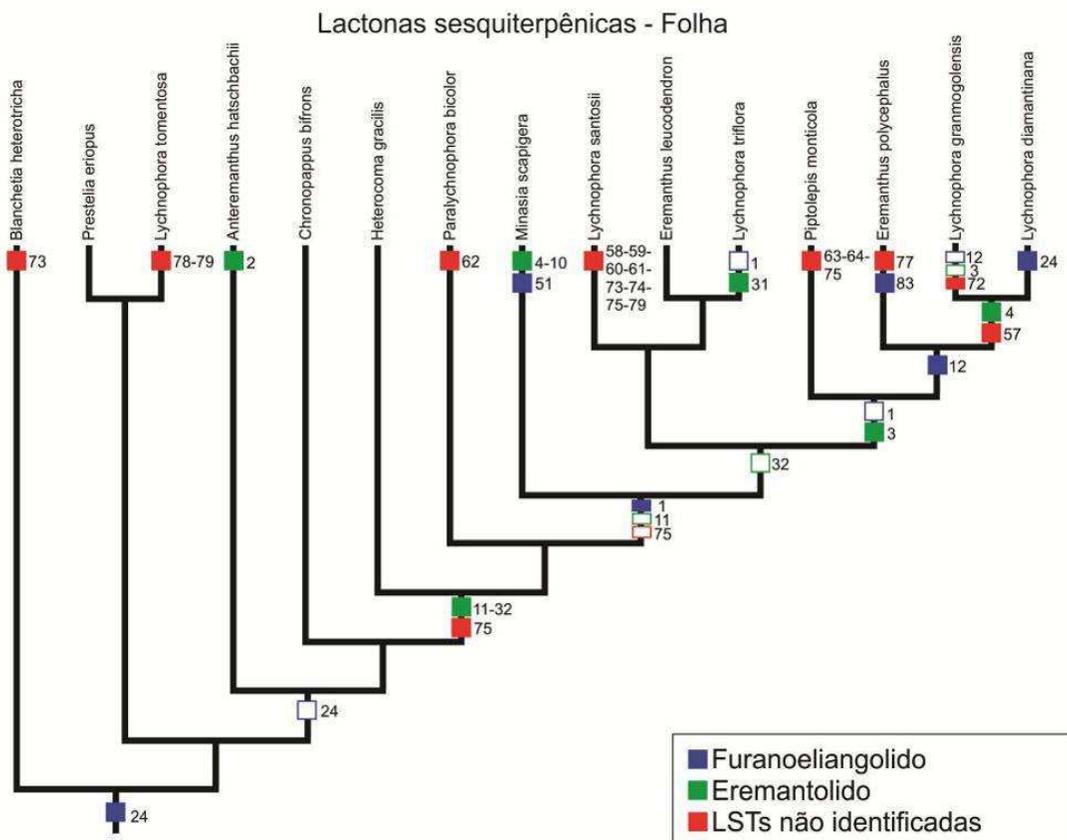


Figura 6. Reconstrução dos estados ancestrais das lactonas sesquiterpênicas (LST) presentes nas folhas (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do caracter. Quadro vazio = perda do caracter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

A substância 12 (5-hidroxi-4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido) também apresentou duas hipóteses para o seu surgimento: na MPR1, o estado teria sido adquirido uma vez (possível sinapomorfia) no ancestral das linhagens mais "derivadas" *Eremanthus polycephalus* + *Lychnophora* s. str., com perda para *Lychnophora granmogolensis* (Fig. 6); na MPR2, o estado teria surgido duas vezes, uma em *E. polycephalus* e outra em *L. diamantinana*. Finalmente, a substância 57 teria surgido uma única vez para o clado *Lychnophora* s. str. (Fig. 6).

Como nas folhas, os caules de todas as espécies analisadas apresentaram flavonoides. Contudo, a reconstrução dos estados ancestrais não indicou sinapomorfias para esta classe (Fig. 7, Tabela 4).

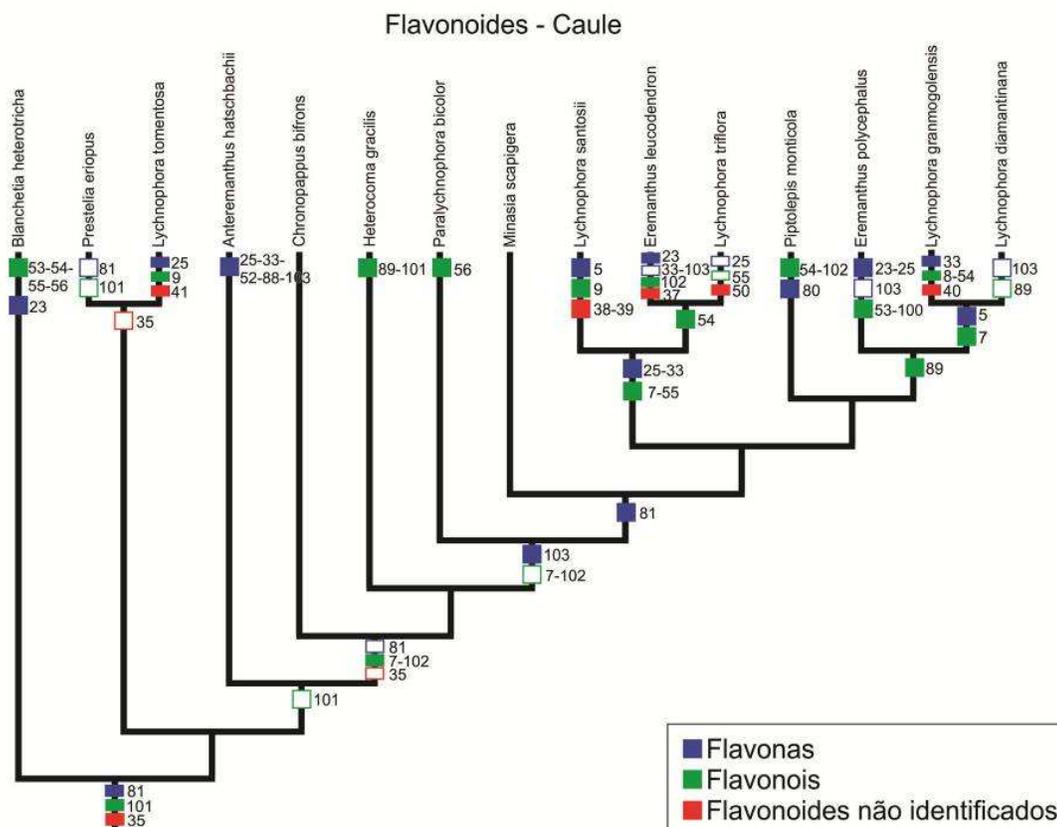


Figura 7. Reconstrução dos estados ancestrais dos flavonoides presentes nos caules (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do caracter. Quadro vazio = perda do caracter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

Para os derivados do ácido *trans*-cinâmico (Fig. 8, Tabela 4), a ocorrência foi semelhante àquela observada no caule, ou seja, apenas em uma espécie (*Eremanthus leucodendron*) as substâncias não foram visualizadas; o mapeamento indicou duas prováveis sinapomorfias, as mesmas observadas para as folhas: substâncias 17 (ácido-3-*O*-(*E*)-cafeoilquínico) e 22 (ácido cafeoilferuloilquínico).

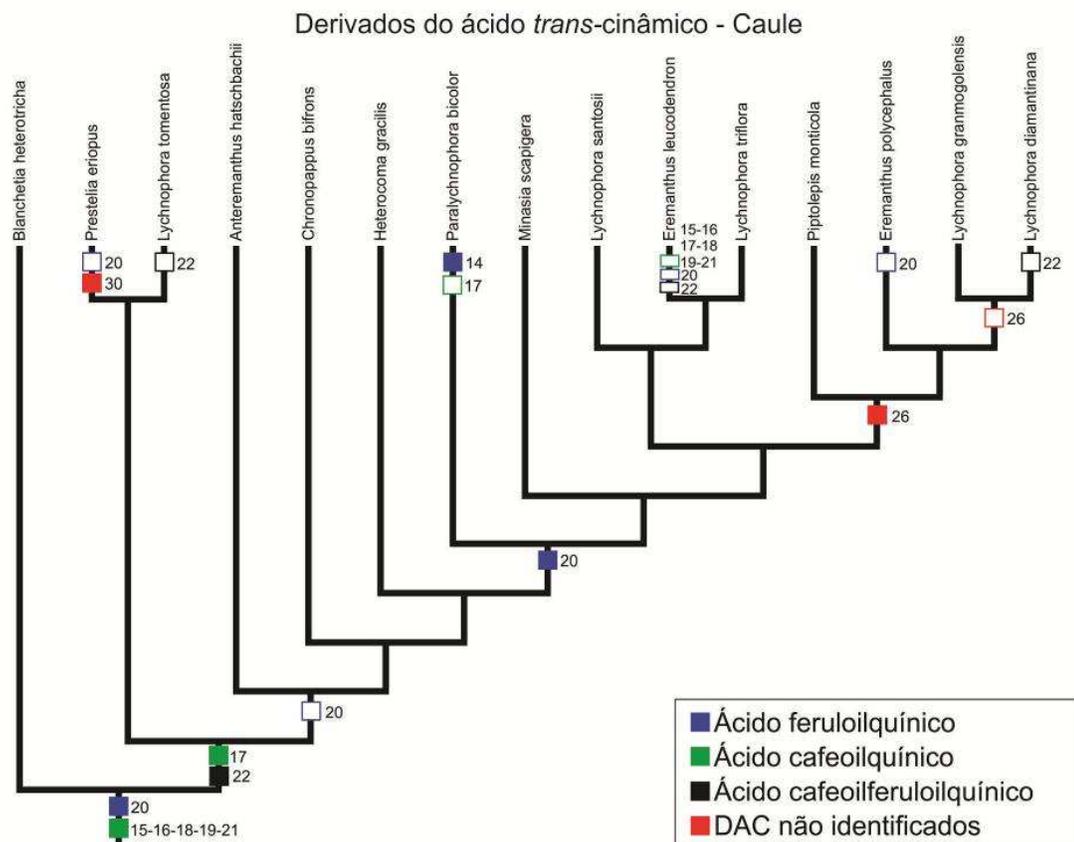


Figura 8. Reconstrução dos estados ancestrais dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (DAC) presentes nos caules (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do carácter. Quadro vazio = perda do carácter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

As lactonas sesquiterpênicas estão presentes no caule da maioria das espécies, com exceção de *Chronopappus bifrons* e de *Prestelia eriopus*; foram observadas duas prováveis sinapomorfias (Fig. 9, Tabela 4): substância 3 (15-hidroxi-eremantolido-B) para as linhagens derivadas *Eremanthus polycephalus* + *Lychnophora* s. str., com única perda para *L. granmogolensis*; e substância 32 (eremantolido C) para *Heterocoma gracilis* + *Paralychnophora bicolor*.

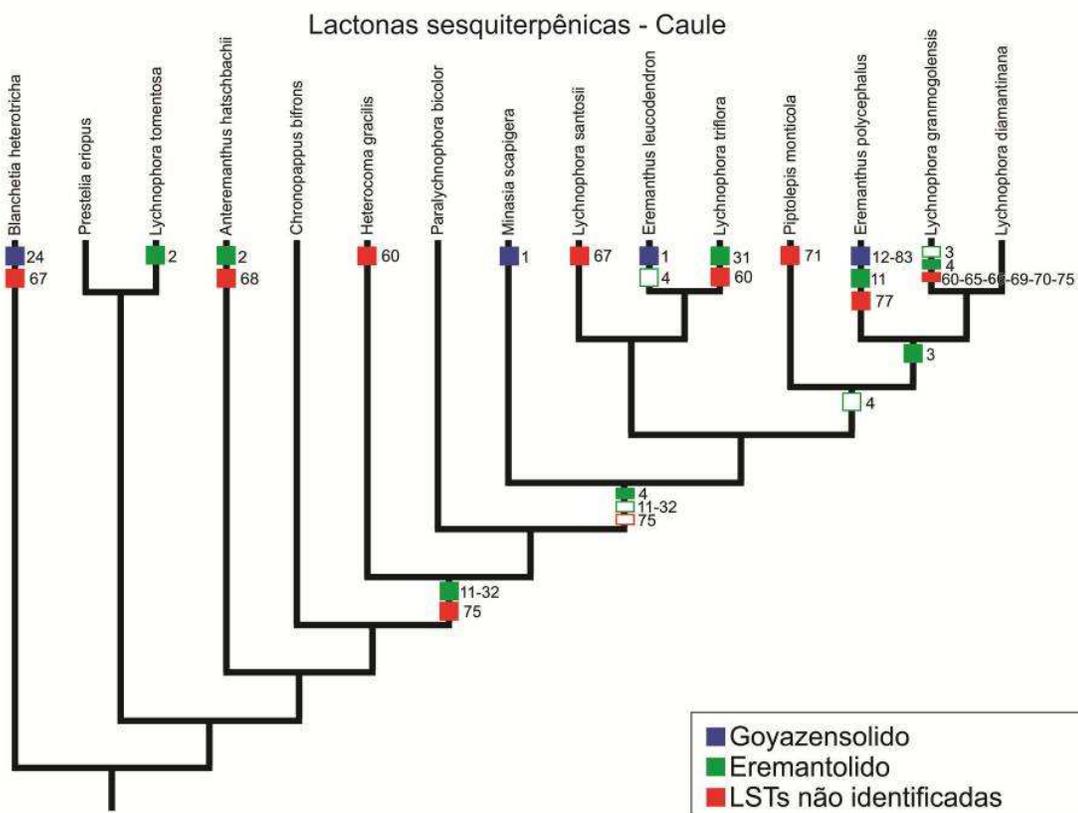


Figura 9. Reconstrução dos estados ancestrais das lactonas sesquiterpênicas (LST) presentes nos caules (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do carácter. Quadro vazio = perda do carácter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

O mapeamento dos poliacetilenos indicou a substância 94 (poliacetileno 4) como uma possível sinapomorfia (Fig. 10, Tabela 4), quando considerada a MPR1. Nessa hipótese, o estado teria surgido no ancestral do clado 'Bahian *Lychnophora*' (*L. santosii* + *Eremanthus leucodendron* + *L. triflora*) com uma perda em *L. triflora*. Na MPR2, o estado teria sido adquirido duas vezes, uma em *L. santosii* e outra em *Eremanthus leucodendron*.

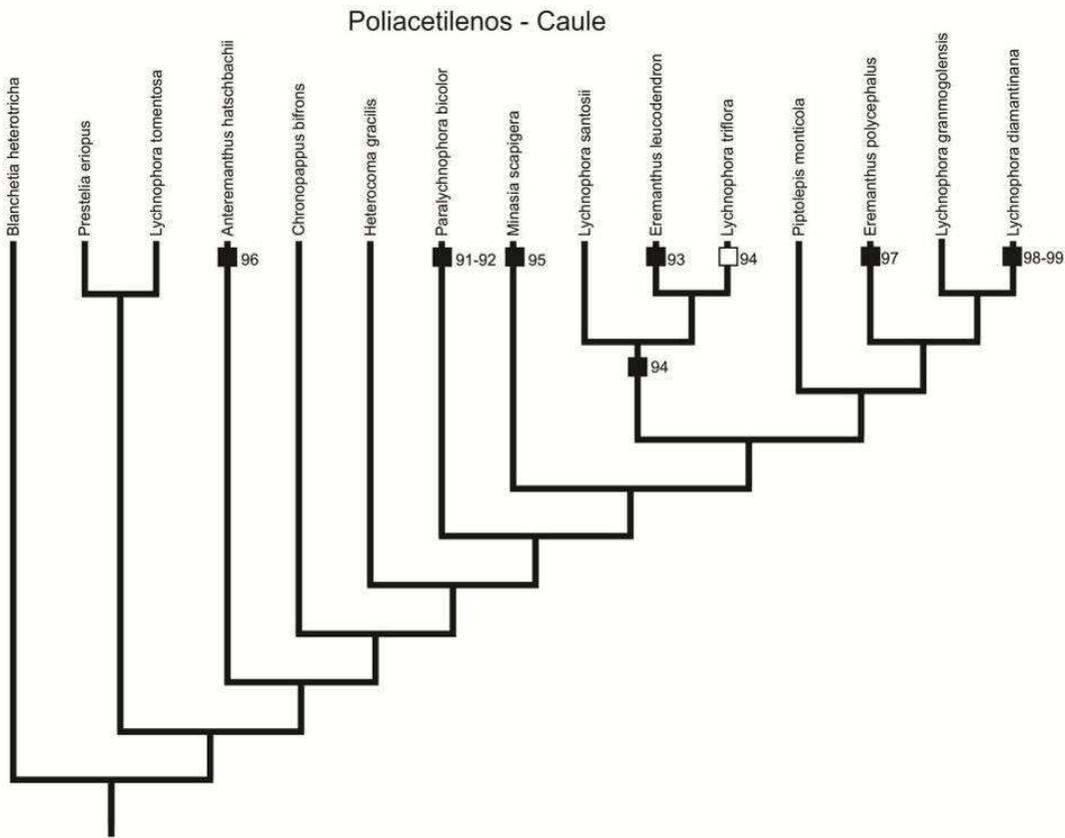


Figura 10. Reconstrução dos estados ancestrais dos poliacetilenos presentes nos caules (em parcimônia). Quadro cheio = aquisição do carácter. Quadro vazio = perda do carácter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4.

A figura 11 sintetiza as prováveis sinapomorfias químicas observadas na subtribo Lychnophorinae. Além disso, foram visualizadas muitas substâncias exclusivas (autapomorfias): 14 flavonoides na folha e 11 no caule (Fig. 4 e 7); três derivados do ácido cinâmico nas folhas e dois nos caules (Fig. 5 e 8); 17 lactonas sesquiterpênicas nas folhas e 11 nos caules (Fig. 6 e 9); e oito poliacetilenos nos caules (Fig. 10).

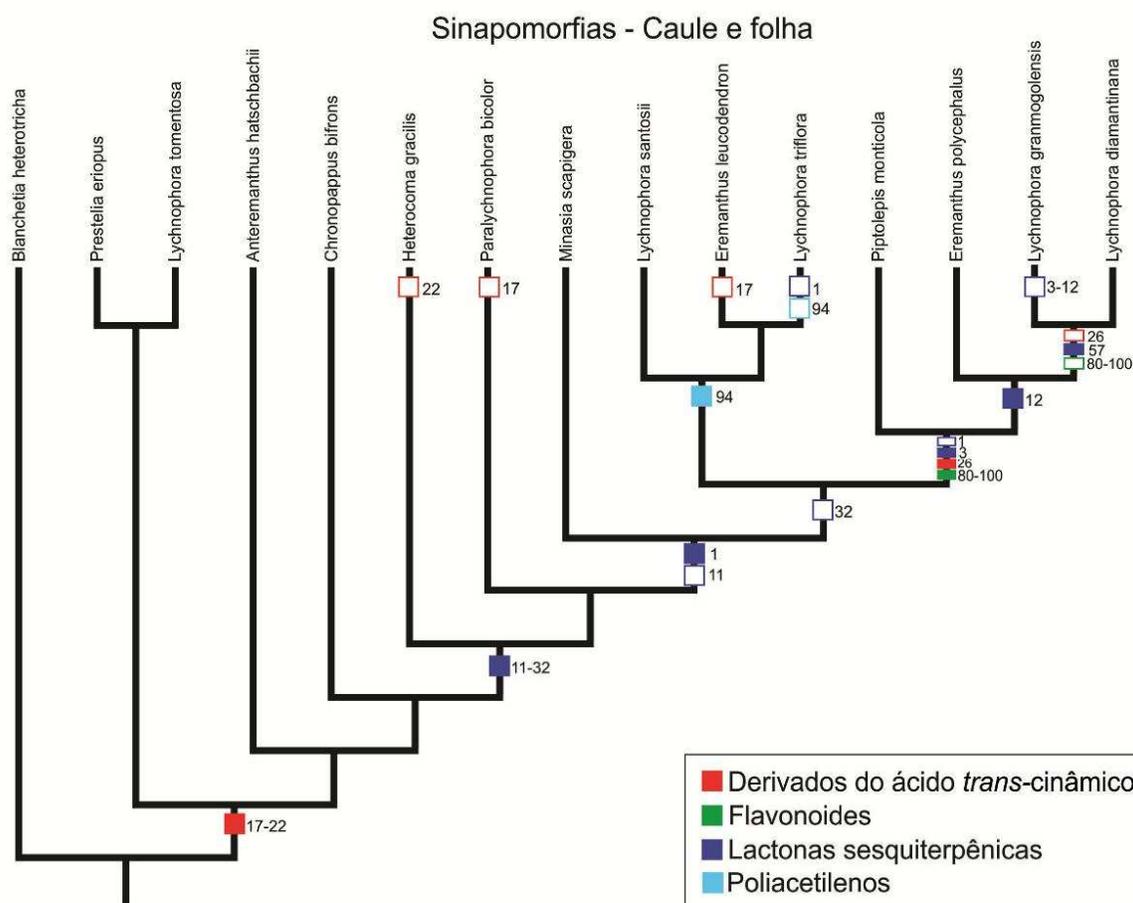


Figura 11. Principais sinapomorfias químicas observadas para as Lychnophorinae, a partir dos extratos de caules e folhas. Cores diferentes representam classes químicas distintas. Quadro cheio = aquisição do carácter. Quadro vazio = perda do carácter. Os números representam os metabólitos secundários identificados, de acordo com a Tabela 4. Cada número indica uma possível sinapomorfia (total = 12 sinapomorfias).

DISCUSSÃO

Histoquímica e localização dos metabólitos secundários

As análises histoquímicas realizadas nesse estudo para as quinze espécies de Lychnophorinae confirmam a presença de classes químicas relacionadas a importantes marcadores quimiotaxonômicos para a subtribo (Keles *et al.*, 2010), dentre eles flavonoides, compostos fenólicos gerais e terpenoides gerais, inclusive lactonas sesquiterpênicas.

Para Asteraceae, tem-se considerado que os tricomas glandulares sejam o principal local de síntese e acúmulo de marcadores quimiotaxonômicos (Spring, 1989; Spring, 1991; Spring, 2001; Sakamoto *et al.* 2005; Da Costa *et al.*, 2005; Appezzato-da-Glória *et al.*, 2012). Entretanto, para a subtribo Lychnophorinae, as análises histoquímicas realizadas nesse estudo indicam que as estruturas responsáveis pela secreção dos metabólitos considerados marcadores quimiotaxonômicos compreendem os tricomas glandulares, mas também idioblastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos nas folhas e nos caules das espécies estudadas. A presença de secreções nesses tecidos foi anteriormente relatada para espécies amplamente distribuídas em Asteraceae, pertencentes às tribos Eupatorieae, Heliantheae, Mutisieae e Vernonieae por Castro *et al.* (1997). Contudo os autores registraram idioblastos distribuídos na epiderme, nas nervuras centrais e laterais e no parênquima clorofiliano. Nesse estudo, nós observamos idioblastos somente na epiderme. Nos demais locais de ocorrência de secreção, os metabólitos estavam distribuídos na maioria das células.

Diferentemente dos demais locais de ocorrência de metabólitos, que foram observados na maioria das espécies de Lychnophorinae, a endoderme secretora é restrita

apenas a *Antheremanthus hatschbachii* e *Eremanthus polycephalus*. A endoderme secretora apesar de não ser comumente descrita na literatura, foi anteriormente observada na tribo Vernonieae (gênero *Vernonia*) por Hayashi e Appezzato-da-Glória (2005), Hayashi e Appezzato-da-Glória (2007) e Cury e Appezzato-da-Glória (2009).

Em todas as estruturas secretoras identificadas em Lychnophorinae, o conteúdo secretado pode ser considerado misto, pela presença de mais de um grupo de substâncias, as quais são geralmente acumuladas ao mesmo tempo. Essa composição mista de metabólitos foi anteriormente observada em espécies da tribo Heliantheae da família Asteraceae (Heinrich *et al.*, 2002; Aschenbrenner *et al.*, 2013). Heinrich *et al.* (2002) observaram substâncias lipofílicas e flavonoides nos tricomas glandulares de *Sigesbeckia jorullensis* e Aschenbrenner *et al.* (2013) observaram terpenoides gerais e lactonas sesquiterpênicas nos tricomas glandulares de *Helianthus*.

Os tricomas glandulares são importantes locais de síntese em Lychnophorinae, pois estão presentes nas folhas de todas as espécies avaliadas e nos caules da maioria delas, sendo responsáveis pela síntese de metabólitos de todas as classes avaliadas. A estrutura desses tricomas é semelhante a outros tricomas glandulares já descritos para as tribos Vernonieae e Eupatorieae de Asteraceae (Monteiro *et al.*, 2001; Appezzato-da-Glória *et al.*, 2012). Os estudos de ontogênese nos tricomas glandulares de Lychnophorinae indicam que o desenvolvimento ocorre apenas nos primórdios foliares e que esse é assincrônico, ou seja, com tricomas em diferentes fases na mesma porção do órgão, o que pode significar uma maior amplitude temporal da fase de secreção. O número de células secretoras na cabeça glandular é variável entre as espécies ou mesmo dentro de uma única espécie, porém, não foi

observada qualquer relação entre tal número e a permanência dos tricomas nos órgãos adultos.

Para a maioria das espécies avaliadas, a fase onde tricomas com secreção são mais abundantes, coincide com as fases de desenvolvimento iniciais das folhas e dos caules, o que pode indicar um papel de proteção aos órgãos jovens, tal como relatado por Siebert (2004) e Machado *et al.* (2006), principalmente relacionado com a inibição de herbívoros e patógenos através da liberação de metabólitos repelentes (Werker, 2000). Apenas nas espécies *Blanchetia heterotricha*, *Eremanthus polycephalus*, *Lychnophora diamantinana* e *L. santosii* foram observados abundantes tricomas com secreção nas folhas completamente expandidas. Amrehn *et al.* (2013) observaram que o aumento da espessura da cutícula do tricoma glandular de *Helianthus annuus*, ao longo do seu desenvolvimento, foi um pré-requisito para prevenir o rompimento prematuro da cutícula. É provável que a manutenção dos produtos da secreção nos tricomas de *B. heterotricha*, *E. polycephalus*, *L. diamantinana* e *L. santosii* seja resultado da resistência da cutícula ao rompimento. Nessas espécies, as folhas completamente expandidas são ricas em secreções provenientes dos tricomas glandulares. Nas demais espécies, as folhas mais jovens são as que apresentam maior abundância de tricomas glandulares com produtos de secreção. O mesmo foi observado para os caules.

Em idioblastos epidérmicos, endoderme secretora e tecidos parenquimáticos das folhas e dos caules de Lychnophorinae, não foram observadas diferenças quanto ao acúmulo de metabólitos entre órgãos jovens e adultos. No entanto, para os caules, é importante salientar que os ramos espessados, especialmente as porções lenhosas, deixam de apresentar os metabólitos de interesse. De acordo com Summer *et al.* (2003) e Allwood e Goodacre (2010), atualmente as técnicas em cromatografia e espectrometria permitem a identificação

de substâncias através do uso de quantidades muito pequenas de material vegetal. Desse modo, aliando-se essas técnicas às informações acerca da localização e da maior abundância das substâncias de interesse, se subsidia a coleta direcionada, visando à preservação das espécies.

Caracterização fitoquímica versus localização da secreção

Os flavonoides, os ácidos fenólicos derivados do ácido *trans*-cinâmico e as lactonas sesquiterpênicas foram identificados em folhas e caules nas espécies analisadas. Diferentemente, os poliacetilenos foram encontrados apenas nos caules. Essas substâncias não foram identificadas em reações histoquímicas, já que na literatura não há reações reconhecidas para essa classe química. Contudo, nenhum poliacetileno foi obtido no extrato de lavagem que prioriza as secreções dos tricomas glandulares, ou seja, a sua presença foi verificada apenas nos extratos totais, indicando que provavelmente estão presentes em tecidos internos.

Os ácidos fenólicos, derivados do ácido *trans*-cinâmico, foram identificados nos extratos totais ou nos extratos de lavagem, separadamente, ou em ambos os extratos, indicando que podem estar presentes em tricomas glandulares, bem como internamente nas folhas e caules de *Lychnophorinae*, o que também é sugerido pelas reações histoquímicas positivas para compostos fenólicos gerais. Entre os flavonoides, algumas substâncias foram distinguidas somente no extrato de lavagem, e provavelmente são secretados apenas em tricomas glandulares. Outros flavonoides foram reconhecidos somente no extrato total, ou conjuntamente em ambos os extratos, nesse caso possivelmente refletem as reações histoquímicas positivas para flavonoides observadas nos idioblastos epidérmicos e no

parênquima clorofiliano e fundamental da folha, assim como, no parênquima fundamental do caule. Recentemente, estudos que aliam técnicas histoquímicas e de cromatografia acoplada a espectrometria de massas para identificação e localização de certos compostos também indicam que compostos fenólicos como flavonoides (Silva *et al.*, 2014) e cumarinas (Tattini *et al.*, 2014) podem ser encontrados no parênquima clorofiliano de folhas.

Em relação às lactonas sesquiterpênicas, nesse estudo foram identificadas diversas substâncias exclusivamente nos extratos de lavagem (que não apareceram no extrato total do mesmo órgão), o que sugere que sejam sintetizadas e armazenadas nos tricomas glandulares e que os extratos de lavagem sejam mais adequados que os extratos totais para a busca de substâncias produzidas nos tricomas. A reação histoquímica indicativa para lactonas sesquiterpênicas também aponta os tricomas glandulares como principal sítio de síntese e acúmulo dessas substâncias. Esse dado está de acordo com os de autores que indicam os tricomas glandulares como principais locais de síntese e acúmulo de lactonas sesquiterpênicas em espécies da família (Spring, 1989; Spring, 1991; Spring, 2001; Da Costa *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.* 2005). Por outro lado, a ocorrência de algumas lactonas sesquiterpênicas apenas nos extratos totais possivelmente indicam a sua presença em tecidos internos. A indicação histoquímica de terpenoides gerais acumulados em células de tecidos parenquimáticos (em folhas e caules) pode estar relacionada com a presença de lactonas sesquiterpênicas nos extratos totais. Além disso, essas reações histoquímicas possivelmente indicam a ocorrência de outros terpenos de baixo peso molecular, os quais não foram extraídos nesse estudo, por apresentarem baixa polaridade, como aqueles presentes em óleos essenciais.

Os dados observados nesse estudo indicam que além das folhas, os caules também apresentam substâncias importantes para os estudos químicos de Lychnophorinae e que ambos os tipos de extração (extrato total e extrato de lavagem) são importantes para a pesquisa das substâncias consideradas marcadores quimiotaxonômicos no grupo. As lactonas sesquiterpênicas são mais eficientemente obtidas pelos extratos de lavagem que priorizam a secreção de tricomas glandulares, enquanto que uma maior amplitude de flavonoides e derivados do ácido *trans*-cinâmico são obtidos pelos extratos totais, e os poliacetilenos podem ser acessados somente a partir de extratos totais.

Evolução dos metabólitos secundários na filogenia de Lychnophorinae

A reconstrução dos estados ancestrais dos metabólitos secundários obtidos pelas análises fitoquímicas sobre a filogenia reduzida de Lychnophorinae, considerando-se as substâncias obtidas de folhas e caules, indica a ocorrência de 13 possíveis sinapomorfias químicas (três flavonoides, cinco derivados do ácido cinâmico, sete lactonas sesquiterpênicas e um poliacetilenos). Entre essas substâncias, duas são possíveis sinapomorfias para caules e folhas - substâncias 17 (ácido-3-*O*-(*E*)-cafeoilquínico) e 22 (ácido cafeoilferuloilquínico). Além disso, o mapeamento também indicou a ocorrência de diversas substâncias exclusivas para os terminais, ou seja, caracteres autapomórficos. Para a hipótese de evolução da subtribo esses caracteres não trazem informações, pois não indicam parentesco. Contudo, como a maioria dos terminais utilizados nesse estudo representa linhagens independentes da filogenia mais recente de Lychnophorinae (Loeuille 2011), as quais são compostas por várias espécies, essas autapomorfias poderiam eventualmente representar sinapomorfias para as linhagens, o que poderia ser verificado num estudo mais abrangente da subtribo.

Os estudos químicos visando investigações evolutivas de Lychnophorinae (Robinson *et al.*, 1980, Bohlmann *et al.*, 1980 e Bohlmann & Jakupovic, 1990) tem indicado a presença de lactonas sesquiterpênicas dos tipos guaianolido e heliangolido (furanoelinagolidos e eremantolidos) para a subtribo. Bohlmann & Jakupovic (1990) também observaram a ausência de glaucolidos na subtribo, os quais são comuns nas subtribos Piptocarphinae, Vernoniinae e Rolandrinae. A hipótese filogenética das Vernonieae americanas indica a presença de heliangolidos nas partes aéreas como a sinapomorfia que caracteriza a subtribo Lychnophorinae (Loeuille, 2011). No presente estudo foram observados heliangolidos (eremantolidos e furanoeliangolidos) distribuídos pela maioria das linhagens de Lychnophorinae, sendo que para essas substâncias foram observadas sete possíveis sinapomorfias. A maioria das linhagens com heliangolidos sinapomórficos apresenta uma boa sustentação na filogenia mais recente de Lychnophorinae (Loeuille, 2011): *Lychnophora* s. s. (Jackknife = 98%; Probabilidade Posterior = 1); *Eremanthus* + *Lychnophora* s. s. (JK = 84%; PP = 0,99); *Piptolepis* + *Eremanthus* + *Lychnophora* s. s. (JK = 55%; PP < 0.9). Também foram observados flavonas e flavonóis amplamente distribuídos, abrangendo todas as linhagens analisadas, e duas prováveis sinapomorfias apresentadas por essas substâncias para o clado *Piptolepis* + *Eremanthus* + *Lychnophora* s. s..

Além disso, a presença de ácidos fenólicos derivados do ácido *trans*-cinâmico e de poliacetilenos, bem como o reconhecimento de possíveis sinapomorfias apresentadas por algumas substâncias desses grupos, trazem importantes contribuições para as investigações químicas e evolutivas da subtribo, pois tradicionalmente essas substâncias são menos reconhecidas como sinapomorfias químicas para a subtribo (Bohlmann *et al.* 1980; Herz *et al.* 1980; Bohlmann *et al.* 1981; Zdero *et al.* 1981; Bohlmann *et al.* 1982; Bohlmann &

Jakupovic 1990; Lunardello *et al.* 1995; Oliveira *et al.* 1996; Vichnewski *et al.* 1999; Sartori *et al.* 2002; Sousa *et al.* 2012). A provável sinapomorfia do poliacetileno 4 está de acordo com as relações de parentesco das 'Bahian *Lychnophora*', espécies que ocorrem exclusivamente no Estado da Bahia, com JK = 59% e PP < 0,9 de sustentação na filogenia (Loeuille, 2011). Enquanto o derivado do ácido cinâmico 1 apoia a relação entre os clados derivados *Piptolepis* + *Eremanthus* + *Lychnophora* s.s. (com sustentação já citada acima), os ácidos 3-*O-E*-cafeoilquínico e cafeoilferuloilquínico sustentam as relações na subtribo desde as linhagens basais a partir do ancestral que origina *Prestelia eriopus* + *Lychnophora tomentosa* até as linhagens mais derivadas. A sustentação desses últimos ramos na filogenia mais recente (Loeuille, 2011) ainda é fraca (JK < 50%; PP < 0,9), o que indica que sinapomorfias químicas como as observadas nesse estudo poderiam contribuir ao maior esclarecimento das relações nessas linhagens em futuras hipóteses de reconstruções filogenéticas para as Lychnophorinae.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo observou-se que as classes de metabólitos secundários relativas aos principais marcadores quimiotaxonômicos de Lychnophorinae são secretadas e armazenadas em tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos das folhas e dos caules. Verificou-se que os tricomas glandulares das folhas são o principal sítio de secreção e acúmulo de lactonas sesquiterpênicas. Os flavonoides e compostos fenólicos gerais são encontrados principalmente na epiderme e no parênquima clorofiliano das folhas e no parênquima fundamental nos caules. Os terpenoides gerais são encontrados tanto em

tricomas glandulares quanto nos tecidos parenquimáticos de caules e folhas.

Os metabólitos de interesse provenientes de tricomas glandulares são predominantes nas fases iniciais do desenvolvimento dos órgãos (folhas jovens e ramos caulinares jovens). Contudo, para as substâncias armazenadas nos tecidos parenquimáticos, órgãos jovens e expandidos são igualmente ricos, com ressalva para as porções lenhosas caulinares que são pobres nos metabólitos de interesse. Assim, a informação gerada nesse estudo pode dar suporte para a coleta seletiva de material vegetal, auxiliando na preservação das espécies.

Os dados apresentados nesse estudo são especialmente interessantes pois, além de indicarem a localização provável dos metabólitos de interesse, apontam possíveis sinapomorfias, inclusive de caracteres químicos menos usuais, como os derivados do ácido *trans*-cinâmico e os poliacetilenos. Assim, espera-se que estudos químicos futuros, abordando um maior número de espécies de Lychnophorinae, possam fornecer informações muito úteis para o esclarecimento de relações filogenéticas ainda parcialmente resolvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allwood, J. W. e Goodacre, R. 2010. An Introduction to Liquid Chromatography – Mass Spectrometry Instrumentation Applied in Plant Metabolomic Analyses. *Phytochemical Analysis*, 21:33–47.

Amrehn, E., Heller, A. e Spring, O. 2013. Capitata glandular trichomes of *Helianthus annuus* (Asteraceae): ultrastructure and cytological development. *Protoplasma*, DOI 10.1007/s00709-013-0534-7.

Appezato-Da-Gloria, B., Hayashi, A. H., Cury, G., Soares, M. K. M. e Rocha, R. 2008. Occurrence of secretory structures in underground systems of seven Asteraceae species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 157: 789-796.

Appezato-Da-Gloria B., Da Costa, F. B., Silva, V. C., Gobbo-Neto, L., Rehder, V. L. G. e Hayashi A. H. 2012. Glandular trichomes on aerial and underground organs in *Chrysolaena* species (Vernonieae – Asteraceae): Structure, ultrastructure and chemical composition. *Flora* 207: 878– 887.

Ascensão, L., Mota, L. e Castro, M. M. 1999. Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany* 84: 437-447.

Aschenbrenner, A. K., Horakh, S. e Spring, O. 2013. Linear glandular trichomes of *Helianthus* (Asteraceae): morphology, localization, metabolite activity and occurrence. *AoB PLANTS* 5: plt028 doi: 10.1093/aobpla/plt028.

Barth, L. R., Fernandes, A. P. M., Ribeiro-Paes, J. T. e Rodrigues, V. 1997. effects of goyazensolide during in vitro cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 427-429.

Bartoli, A., Galati, B. G. e Tortosa, R. D. 2011. Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (Astereae, Asteraceae). *Flora* 206: 1063–1068.

Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M. e Robinson, H. 1980a. Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. *Phytochemistry* 19: 2663-2668.

_____ **1980b.** Seven guaianolides from the tribe Vernonieae. *Phytochemistry* 19: 2669-2673.

Bohlmann, F., Gupta, R. K., Jakupovic, J., Robinson, H. e King, R. M. 1981. Three germacranolides and other constituents from *Eremanthus* species. *Phytochemistry* 20: 1609-1612.

Bohlmann, F., Singh, P., Zdero, C., Ruhe, A., King, R. M. e Robinson, H. 1982. Furanoheliangolides from two *Eremanthus* species and from *Chresta sphaerocephala*. *Phytochemistry* 21: 1669-1673.

Bohlmann, F. e Jakupovic, J. 1990. Progress in the chemistry of the *Vernonieae*

(Compositae). *Plant Systematics and Ecology*, Suppl. 4: 3-43.

Calabria, L. M., Emerenciano, V. P., Scotti, M. T., Mabry, T. J. 2009. Secondary chemistry of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Michigan, Sheridan Books, 73-88.

Carlquist, S. 1958. Structure and ontogeny of glandular trichomes of *Madinae* (Compositae). *American Journal of Botany* 45: 675–682.

Castro, M. M., Leitão-Filho, H. F. e Monteiro, W. R. 1997. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 20: 163–174.

Charrière-Ladreix, Y. 1976. Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L., Berlin, *Planta*, p. 167-174.

Cury, G. e Appezzato-da-Gloria, B. 2009. Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species. *Australian Journal of Botany* 57: 229-239.

Da Costa, F. B., Terfloth, L. e Gasteiger, J. 2005. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemo systematics. *Phytochemistry* 66: 345-353.

David, R.e J. Carde, 1964. Histochimie - coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI: *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences*, p. 1338.

Geissman, T. A. e Griffin, T. S. 1971. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid in structure determination. *Phytochemistry* 10: 2475-2485.

Göpfert, J. C., Heil, N., Conrad, J. e Spring, O. 2005. Cytological development and sesquiterpene lactone secretion in capitate glandular trichomes of sunflower. *Plant Biol* 7: 148–155.

Hayashi, A. H. e Appezzato-Da-Gloria, B. 2005. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V-platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. *Australian Journal of Botany* 53: 273–279.

Hayashi, A. H. e Appezzato-Da-Gloria, B. 2007. Anatomy of the underground system in *Vernonia grandiflora* Less. and *V-brevifolia* Less. (Asteraceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 979-988.

Heinrich, G., Pfeifhofer, H. W., Stabentheiner, E. e Sawidis, T. 2002. Glandular Hairs of *Sigesbeckia jorullensis* Kunth (Asteraceae): Morphology, Histochemistry and Composition of Essential Oil. *Annals of Botany* 89: 459-469.

Herz, W., Kumar, N., Vichnewski, W. e Blount, J. F. 1980. Cytotoxic sesquiterpene lactones of *Eremanthus incanus* and *Heterocoma albida*. Crystal structure and stereochemistry of eregoyazin. *Journal of Organic Chemistry* 45: 2503-2506.

Jensen, W. A. 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. W. H. Freeman, San Francisco.

Johansen, D., 1940. *Plant microtechnique*: New York, McGraw-Hill Book Co. Inc. 523p.

Karnovsky, M. J., 1965. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, *The Journal of cell Biology* 27: 137a-138a.

Keles, L. C., Melo, N. I., Aguiar, G. P., Wakabayashi, K. A. L., Carvalho, C. E., Cunha, W. R., Crotti, A. E. M., Lopes, J. L. C. e Lopes, N. P. 2010. Lychnophorinae (asteraceae): a survey of its chemical constituents and biological activities. *Quim. Nova* 33: 2245.

Kirk, Jr. P.W. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45: 1-4.

Lestern, N. R. e Curtis, J. D. 1985. Distribution and anatomy of hydathodes in Asteraceae. *Botanical Gazette* 146: 106-114.

Loeuille, B. F. P., 2011. Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae). Thesis submitted to the Institute of Biosciences, University of São Paulo., Universidade de São Paulo, São Paulo.

Lunardello, M. A., Tomaz, J. C., Vichnewski, W. e Lopes, J. L. C. 1995. Sesquiterpenes lactones and flavonoids from *Eremanthus mattogrossensis* and *Eremanthus eriopus*. *Journal of the Chemical Brazilian Society* 6: 307-311.

Lusa, M.G., Appezzato-da-Glória, B., Loeuille, B., Bartoli, G. e Ciccarelli, D.. 2014. Functional groups in Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae) based on morphological and anatomical traits. *Australian Journal of Botany* 62: 150-163.

Machado, S. R., Gregório, E. A. e Guimarães, E. 2006. Ovary Peltate Trichomes of *Zeyheria Montana* (Bignoniaceae): Developmental Ultrastructure and Secretion in Relation to Function. *Annals of Botany* 97: 357-369.

Maddison W, Maddison D. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. <http://mesquiteproject.org>.

Metcalf, C. R. e Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Clarendon Press, Oxford.

Monteiro, W. R., Castro, M. M., Mazzoni-Viveiros, S. C. e Mahlberg, P. G. 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. *Revta brasil. Bot.*24: 349-357.

Nakajima JN, Teles AM, Ritter M, Mondin CA, Dematteis M, Heiden G, Borges XB, Rivera VL, Bringer Jr JBA, Saavedra M, de Cássia Araújo Pereira R, Sales-de-Melo MRC. 2009. Asteraceae. In: Giulietti AM, ed. *Plantas raras do Brasil: Conservação Internacional*. Belo Horizonte. Universidade Estadual de Feira de Santana, 76-89.

Nakajima JN, Dematteis M, Loeuille B, et al. 2013. Asteraceae. In: Martinelli G, Moraes MA, eds. *Livro vermelho da flora do Brasil*. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 203-286.

Oliveira, A. B., Saúde, D. A., Perry, K. S. P., Duarte, D. S., Raslan, D. S., Boaventura, M. A. D. e Chiari, E. 1996. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytotherapy Research*. 10: 292-295.

Robinson, H. 1999. Generic and subtribal classification of American Vernoniae. *Smithsonian Contributions to Botany* 89.

Robinson, H.; Bohlmann, F. e R. M. King. 1980. Chemosystematics notes of the Asteraceae, III : natural subdivisions of the Vernoniae. *Phytologia* 46: 421–436.

Sakai, W. S. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 48: 247-249.

Sakamoto, H. T., Gobbo-Neto, L., Cavalheiro, A. J., Lopes, N. P. e Lopes, J. L. C. 2005. Quantitative HPLC Analysis of Sesquiterpene Lactones and Determination of Chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 16 (6B): 1396-1401.

Sartori, F. T., Barrachia, A. C., Sacilotto, C., Lopes, J. L. C., Lopes, N. P. e Vichnewski, W. 2002. Phytochemical study of *Lychnophora markgravii* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 609-612.

Saude, D. A, Barrero, A. F., Oltra, J. E., Justicia, J., Raslan, D. S. e Silva, E.A. 2002. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 12: 7-10.

Siebert, D. J. 2004. Localization of Salvinorin A and Related Compounds in Glandular Trichomes of the Psychoactive Sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany* 93: 763-771.

Silva, D. B., Turatti, I. C. C., Gouveia, D. R., Ernst, M., Teixeira, S. P., Lopes, N. P. 2014. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. *Scientific Reports* 4: 1-8.

Silvério, M. S., Sousa, O. V., Del-Vechio-Vieira, G., Miranda, M. A., Matheus, F.C e Kaplan, M. A. C. 2008. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 430-435.

Souza, O. V. de, Dutra, R. C., Yamamoto, C. H. e Pimenta, D. S. 2008. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. *Revista Brasileira de Farmácia* 89: 113-116.

Sousa, J. P. B., Tomaz, J. C., Silva, C. C. P., Ellena, J., Lopes, N. P. e Lopes, J. L. C. 2012. Novel sesquiterpene lactones from *Eremanthus seidelli*. *Tetrahedron Letters* 53: 6339–6342.

Spring, O., Benz, T. e Ilg, M. 1989. Sesquiterpene lactones of the capitate glandular trichomes of *Helianthus annuus*. *Phytochem* 28:745–749.

Spring, O. 1991. Trichome microsampling of sesquiterpene lactones for the use of systematic studies. *Recent Advances in Phytochemistry*. 25: 319–345.

Spring, O., Zipper, R., Klaiber, I., Reeb, S. e Vogler, B. 2000. Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 55: 255-261.

Spring, O., Zipper, R., Reeb, S., Vogler, B. e Da Costa, F. B. 2001. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry* 57: 267-272.

Sumner, L. W., Mendes, P. e Dixon, R. A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817–836.

Tattini, M., Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Goti, A., Pollastri, S., Bellasio, C., Giordano, C., Fini, A. e Agati, G. 2014 (in press). Esculetin and esculin (esculetin 6-O-glucoside) occur as inclusions and are differentially distributed in the vacuole of palisade cells in *Fraxinus ornus* leaves: a fluorescence microscopy analysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.06.012>.

Vichnewski, W. e Gilbert, B. 1972. Schistosomicidal sesquiterpene lactone from *Eremanthus elaeagnus*. *Phytochemistry* 11: 2563-2566.

Vichnewski, W., Sarti, S. J., Gilbert, B. e Herz, W. 1976. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. *Phytochemistry* 15: 191-193.

Vichnewski, W., Skrochy, C. A., Nasi, A. M. T. T., Lopes, J. L. C. e Herz, W. 1999. 15-Hydroxyeremantholide B and derivatives from *Eremanthus arboreus*. *Phytochemistry* 50: 317-320.

Werker, E. 2000. Trichome diversity and development: Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology, 31: 1-35.

Yaoita, Y., Kikushi, M. e Machida, K. 2012. Terpenoids and related compounds from plants of the family Compositae (Asteraceae). *Natural Product Communications* 7: 533-538.

Zdero, C., Bohlmann, F., Robinsons, H. e King, R. M. 1981. Germacranolides from *Proteopsis argentea*. *Phytochemistry* 20: 739-741.

CAPÍTULO 2

**Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos e folhas de
Lychnophorinae (Vernonieae: Asteraceae)**

Ocorrência e evolução da fitomelanina em caules aéreos e folhas de Lychnophorinae (Vernonieae: Asteraceae)

RESUMO

A fitomelanina é caracterizada como uma substância mecanicamente dura, resistente, de coloração marrom a negra, predominantemente relatada em sementes e cipselas. Nesse estudo relata-se pela primeira vez a ocorrência dessa substância em órgãos vegetativos aéreos e se caracteriza a sua evolução nas principais linhagens de Lychnophorinae. Procurou-se investigar: como a fitomelanina é distribuída nos órgãos vegetativos aéreos? Quais são os padrões de deposição da fitomelanina nos tecidos e órgãos? Como ocorreu a evolução da fitomelanina nesses órgãos? Amostras de folhas e caules de 77 espécies foram analisadas utilizando técnicas usuais em anatomia vegetal. A reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foi efetuada em parcimônia utilizando uma filogenia baseada em dados morfológicos e moleculares. A deposição de fitomelanina em Lychnophorinae está frequentemente associada às esclereídes, ocorrendo em espaços intercelulares. De um modo geral, as porções espessadas dos caules são os locais de maior ocorrência de fitomelanina. Além disso, observou-se que as espécies podem apresentar padrões de deposição de fitomelanina, principalmente relacionados a diferentes processos de formação da esclereíde. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres sugerem que o ancestral comum mais recente das Lychnophorinae apresentava fitomelanina no floema secundário e na medula do caule espessado. Nas demais regiões dos caules e nas folhas de Lychnophorinae, a fitomelanina teria surgido posteriormente, ao longo da evolução do grupo.

Palavras-chave: fitomelanina, esclereídes, caules, folhas, evolução, Lychnophorinae.

INTRODUÇÃO

As melaninas são substâncias escuras ou pigmentos, insolúveis em solventes ordinários e sujeitos ao branqueamento por agentes oxidantes, sendo isolados de tecidos animais, de fungos e vegetais e, de acordo com a sua origem metabólica, podem ser considerados "indol melaninas" - em animais - ou "catecol melaninas" - em fungos e vegetais (Nikolaus, 1964). No reino vegetal, esses pigmentos são denominados fitomelaninas e são predominantemente relatados em sementes de Asparagales e cípselas de Asteraceae (Wittich e Graven, 1995; Pandey e Dhakal, 2001). A fitomelanina é caracterizada como uma substância que forma uma camada mecanicamente dura, resistente, de coloração marrom a negra, podendo desempenhar a função de proteção contra herbivoria, contra a invasão fúngica e microbiana, prevenindo contra a deterioração e hidratação, e como barreira à luz visível, protegendo o embrião de uma prematura quebra da dormência (Pandey *et al.*, 1989; Wittich e Graven, 1995; Pandey e Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009).

Em sementes de Asparagales, a fitomelanina constitui uma sinapomorfia para a ordem (Kubtzki 1998). Em Asteraceae, é descrita em cípselas de espécies pertencentes às tribos da Aliança Heliantheae (tribos Bahieae, Chaenactideae, Coreopsidae, Eupatorieae, Feddeae, Helenieae, Heliantheae, Madieae, Millerieae, Neurolaeneae, Perityleae, Polymnieae e Tageteae) (Funk *et al.*, 2009; Pandey *et al.* 2014), sendo melhor documentada em Eupatorieae e Heliantheae (Pandey *et al.*, 1989; Pandey, 1998; Pandey e Dhakal, 2001; Marzinek *et al.* 2008; Marzinek e Oliveira, 2010; De-Paula *et al.*, 2013) e em Coreopsidae (Tadesse e Crawford, 2014). Além disso, a fitomelanina está presente na tribo Cardueae e é reconhecida raramente em Vernonieae e Athroismeae (Funk *et al.*, 2009; Robinson, 2009;

Loeuille *et al.* 2013). De acordo com a literatura, a ocorrência de fitomelanina em Asteraceae está exclusivamente associada ao pericarpo das cipselas.

Sobre indícios da presença de fitomelanina em órgãos vegetativos de Asteraceae, existem poucas informações. Semir *et al.* (2011) discorrendo sobre as adaptações ambientais das espécies de *Lychnophora* sensu lato - 64 espécies incluídas atualmente na subtribo Lychnophorinae - citam a presença de uma camada enegrecida na circunferência do caule, e supõem que a composição da camada possivelmente seja de fitomelanina. Além disso, estudos recentes abordando raízes e rizomas de espécies da tribo Cardueae relatam a presença de esclereídes com deposição de fitomelanina nesses órgãos (Fritz e Saukel, 2011; Upton 2011). Assim, a presença de fitomelanina na família Asteraceae pode estar subestimada, em termos de ocorrência nas espécies, mas principalmente, em relação à sua presença em outros órgãos do corpo da planta (além das cipselas), o que foi previamente sinalizado por De-Paula *et al.* (2013).

As espécies investigadas nesse estudo pertencem à subtribo de Lychnophorinae, a qual é praticamente endêmica do Brasil (com apenas uma espécie ocorrendo na Bolívia) e contém 18 gêneros e 104 espécies (Loeuille 2011). A maioria das espécies está restrita aos campos rupestres nos planaltos do sudeste e nordeste do Brasil, inseridas no Domínio Cerrado, uma região que representa um dos centros de diversidade de Vernoniaeae.

Nesse estudo relata-se pela primeira vez a ocorrência de fitomelanina em caules aéreos e folhas de Lychnophorinae, assim como a sua evolução em 17 linhagens principais da subtribo. A combinação de dados oriundos de análises filogenéticas e de características morfológicas e anatômicas tem sido abordada recentemente (Pace *et al.* 2011; Pace e Angyalossy 2013; Nogueira *et al.* 2013) e tem se mostrado útil para melhorar a compreensão

dos padrões de mudança morfológica de certas características. Desse modo, o presente estudo pretende responder às seguintes questões: (1) Como a fitomelanina é distribuída nos órgãos vegetativos aéreos de Lychnophorinae? (2) Quais são os padrões de deposição da fitomelanina observados entre as espécies? (3) E como ocorreu a evolução da fitomelanina nos órgãos aéreos em Lychnophorinae?

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Nesse estudo foram analisadas ao todo 77 espécies. Para a verificação da formação e ocorrência de fitomelanina ao longo dos órgãos vegetativos aéreos de Lychnophorinae, foram analisadas 13 espécies, representantes dos principais clados da subtribo, de acordo com a recente filogenia baseada em dados moleculares e morfológicos (Loeuille, 2011). Foram realizados estudos estruturais da folha - bainha e, ou pecíolo e terço médio da lâmina - e dos caules - do ápice às regiões espessadas onde se inicia a porção lenhosa dos ramos (no caso de arbustos e arvoretas) ou de todo o eixo caulinar (em plantas caulirosuladas). Foram avaliados três indivíduos para cada espécie, sendo um sistema caulinar e três folhas para cada indivíduo. Para essa parte do estudo, o material botânico foi coletado ao longo da Cadeia do Espinhaço, nos Estados de Minas Gerais e da Bahia. Exsicatas foram depositadas no Herbário SPF (Apêndice 1).

Além disso, para a verificação da presença ou ausência de fitomelanina nos mesmos órgãos foram analisadas 62 espécies herborizadas, pertencentes a 16 gêneros da subtribo Lychnophorinae, a mesma amostragem daquela usada para reconstruir a filogenia,

representando cerca de 75% da subtribo (Loeuille, 2011). Além das espécies de Lychnophorinae, foi utilizado material herborizado de duas espécies de Vernonieae (*Chresta pacourinoides* e *Piptocarpha oblonga*) eleitas como grupos externos, os mesmos usados na filogenia de Lychnophorinae (Loeuille, 2011). As amostras foram obtidas conforme o protocolo anteriormente citado, enfocando as regiões de maior interesse para a identificação da fitomelanina nos tecidos. Foram coletadas três folhas e as porções apicais dos ramos, assim como as porções espessadas mais lenhosas. Uma lista com as espécies analisadas e os respectivos vouchers está disponível no Apêndice 1.

Caracterização micromorfológica

Para o estudo estrutural dos órgãos vegetativos aéreos as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965, modificada com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), submetidas à bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos, desidratadas em série etílica e infiltradas em resina plástica hidróxi-etil-metacrilato Leica Historesin® (Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany) segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (Modelo RM 2245 Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) com navalha de aço do tipo C, na espessura de 5-7 µm. Lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina 0,05% em tampão citrato-fosfato, pH 4.5 (Sakai, 1973) e montadas em resina sintética Entellan® (Merck®). A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir das lâminas usando câmera de vídeo Leica® DC 300F acoplada ao Microscópio Leica® DM LB (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

Para as análises de presença ou ausência de fitomelanina, a partir do material

herborizado, as amostras foram reidratadas em solução de álcool, água e glicerina na proporção 1:1:1 (modificado de Alcorn & Ark, 1953) e seccionadas em micrótomo de deslize (Modelo SM 2000R Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) ou à mão livre com auxílio de lâmina de barbear. Devido à coloração natural da fitomelanina, não foi necessário o uso de corantes nas secções do material herborizado. Foram montadas lâminas semipermanentes com o material histológico e gelatina glicerinada, as quais foram observadas em microscópio Leica modelo CME 1349521X (Leica Microsystems, Buffalo, U.S.A.).

Identificação da fitomelanina nas secções histológicas

Nas amostras analisadas, as deposições de substâncias de coloração escura marrom-enebecida, resistente e insolúvel em solventes polares, foram denominadas de fitomelanina, baseando-se nas definições adotadas na literatura (Thomson, 1976; Wittich e Graven, 1995; Pandey e Dhakal, 2001) e nas semelhanças dos materiais analisados àqueles relatados na literatura para Asteraceae (Pandey et al., 1989; Pandey, 1998; Marzinek et al. 2008; Marzinek e Oliveira, 2010; Fritz e Saukel, 2011; Upton 2011; De-Paula et al., 2013).

Padrão de evolução da fitomelanina e codificação dos caracteres

Para mapear a ocorrência da fitomelanina entre os diferentes tecidos e órgãos das Lychnophorinae ao longo da sua história evolutiva, nesse estudo utilizou-se a árvore filogenética de consenso estrito de 44 árvores igualmente parcimoniosas resultante da análise combinada dados moleculares (ITS, ETS, *ndhF* e *rpl32-trnL*) e morfológicos realizada por Loeuille (2011). As análises avaliaram a presença e a ausência de fitomelanina (dados

binários), de acordo com a sua ocorrência em cada tecido e órgão da planta considerado: córtex, floema, xilema e medula (tanto para porções jovens, quanto para porções espessadas do caule), bainha, pecíolo e limbo foliares. Os dados foram considerados separadamente ou no conjunto de tecidos para cada órgão (Apêndice 3). A reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foi efetuada em parcimônia com o programa Mesquite 2.74 (Maddison e Maddison 2007). Para os nós onde havia ambiguidade, foram geradas e relatadas as 'reconstruções mais parcimoniosas' ('Most Parsimonious Reconstructions' - MPRs).

RESULTADOS

Deposição da fitomelanina e ocorrência nos órgãos

A ocorrência da fitomelanina nas 75 espécies avaliadas está ilustrada no Apêndice 3, de acordo com a localização nos órgãos vegetativos aéreos e, ou nos respectivos tecidos. Em todos os tecidos e órgãos, a deposição da fitomelanina está associada às esclereídes já diferenciadas (Fig. 1A) ou, menos comumente, às células parenquimáticas (Fig. 1B) as quais se diferenciam em esclereídes posteriormente (Fig. 1C). A deposição ocorre nos espaços intercelulares formados entre os grupos de células citadas. Em geral, as esclereídes têm formato semelhante, sendo pouco alongadas longitudinalmente, mas variam em relação ao seu tamanho, entre as espécies (Fig. 1A-E) e ocorrem isoladamente (Fig. 1E-F) ou mais frequentemente em grupos (Fig. 1A, 1C e 1G). As esclereídes apresentam pontoações simples (eventualmente ramificadas) (Fig. 1A e 1G-H).

Nas porções jovens dos ramos ou dos eixos caulinares, os tecidos primários que mais comumente apresentam esclereídes com fitomelanina são o parênquima cortical e medular

(Fig. 2A). A presença de esclereídes com fitomelanina no floema primário é incomum, aparecendo apenas em quatro espécies (Apêndice 3), enquanto que é rara no xilema, com registro apenas para uma espécie (Apêndice 3). Nas porções mais espessadas dos ramos ou do eixo caulinar, onde ocorre o crescimento secundário do órgão, é muito comum a ocorrência de esclereídes com deposição de fitomelanina no floema secundário (Fig. 2B). As esclereídes se organizam geralmente em grupos (Fig. 2B), os quais são mais frequentes, e envoltos por maior quantidade de fitomelanina nos caules espessados do que nas porções jovens dos ramos (Fig. 1F e 2B). A presença de esclereídes com fitomelanina no xilema secundário dos caules espessados é menos comum, sendo visualizada em apenas nove espécies da subtribo (Fig. 2C-D, Apêndice 3).

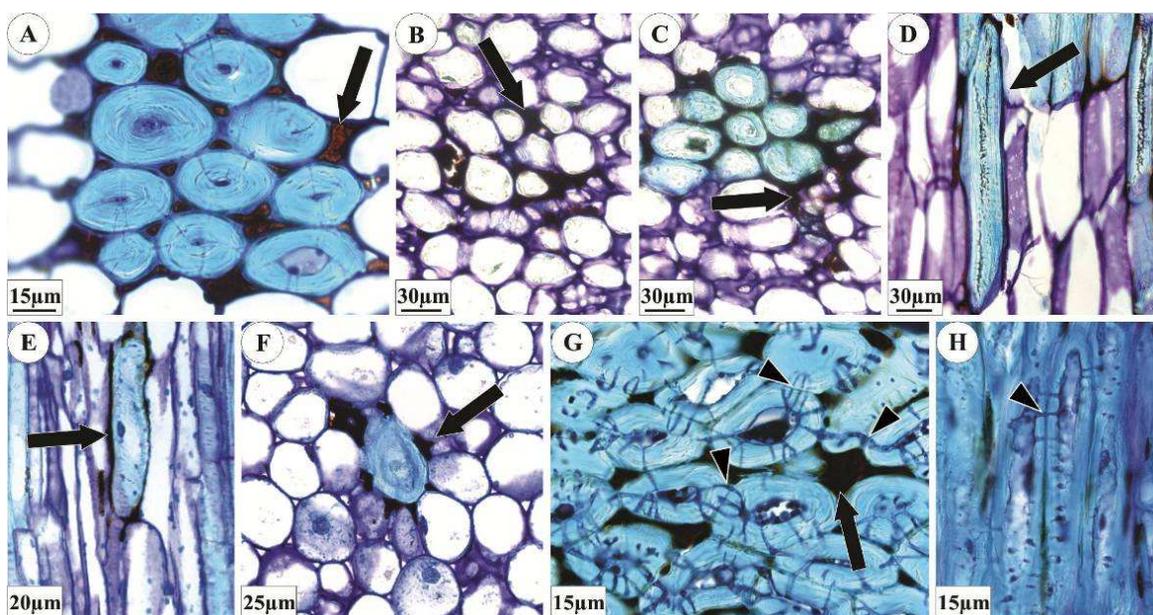


Figura 1. Esclereídes e células parenquimáticas associadas à deposição de fitomelanina (setas). Coloração com azul de toluidina. Secções transversais (A-C, F-G) e longitudinais (D-E, H) dos caules de *Heterocoma gracilis* (A), *Prestelia eriopus* (B-D), *Eremanthus polycephalus* (E), *Lychnophora diamantinana* (F) e *Minasia scapigera* (G-H). A. Esclereídes em grupo, completamente formadas, evidenciando grande espessura parietal e fitomelanina nos espaços intercelulares. B-C. Células parenquimáticas com deposição de fitomelanina (B) que se esclerificam após o início da deposição de fitomelanina (C). D-E. Secções

longitudinais evidenciando o formato das esclereídes, bem como o depósito de fitomelanina em todo o contorno da célula. F. Esclereíde isolada. G-H. Canais de pontuação (cabeça de seta) entre as esclereídes.

Com o contínuo crescimento e espessamento secundário dos ramos ou eixos caulinares, os grupos de esclereídes envoltas por fitomelanina, presentes no córtex e no floema secundário, tendem a alcançar a periferia dos caules (Fig. 2B-C e 2E) fazendo limite com os tecidos de revestimento. Os grupos de esclereídes envoltas por fitomelanina inicialmente ficam justapostos à epiderme (Fig. 2E) e posteriormente, às camadas de células suberificadas do revestimento secundário (Fig. 3A-D). Esse revestimento secundário não é uma periderme propriamente dita, pois não há formação de felogênio, apenas divisões periclinais em células parenquimáticas que se suberificam. Nas porções lenhosas do caule, as divisões periclinais podem ocorrer múltiplas vezes, inicialmente no córtex e posteriormente no floema secundário, de tal forma que diferentes camadas de células suberificadas, entremeadas por tecido floemático, formam uma estrutura similar ao ritidoma, a qual geralmente inclui esclereídes com fitomelanina (Fig. 3C).

Em algumas espécies (Apêndice 3), as bainhas, os pecíolos ou as lâminas das folhas expandidas também apresentam esclereídes com deposições de fitomelanina (Fig. 3D-H). Quando ocorre na lâmina foliar, as esclereídes com fitomelanina são visualizadas na região da nervura central (Fig. 3G). A ocorrência de fitomelanina é mais notável nas bainhas que permanecem aderidas aos caules após a senescência foliar, nesses casos, também ocorre a suberificação nas bainhas posteriormente à senescência foliar (Fig. 3D e 3H). A ocorrência de fitomelanina na folha é, no entanto, menos frequente entre as espécies, comparando-se à sua ocorrência no caule (Apêndice 3).

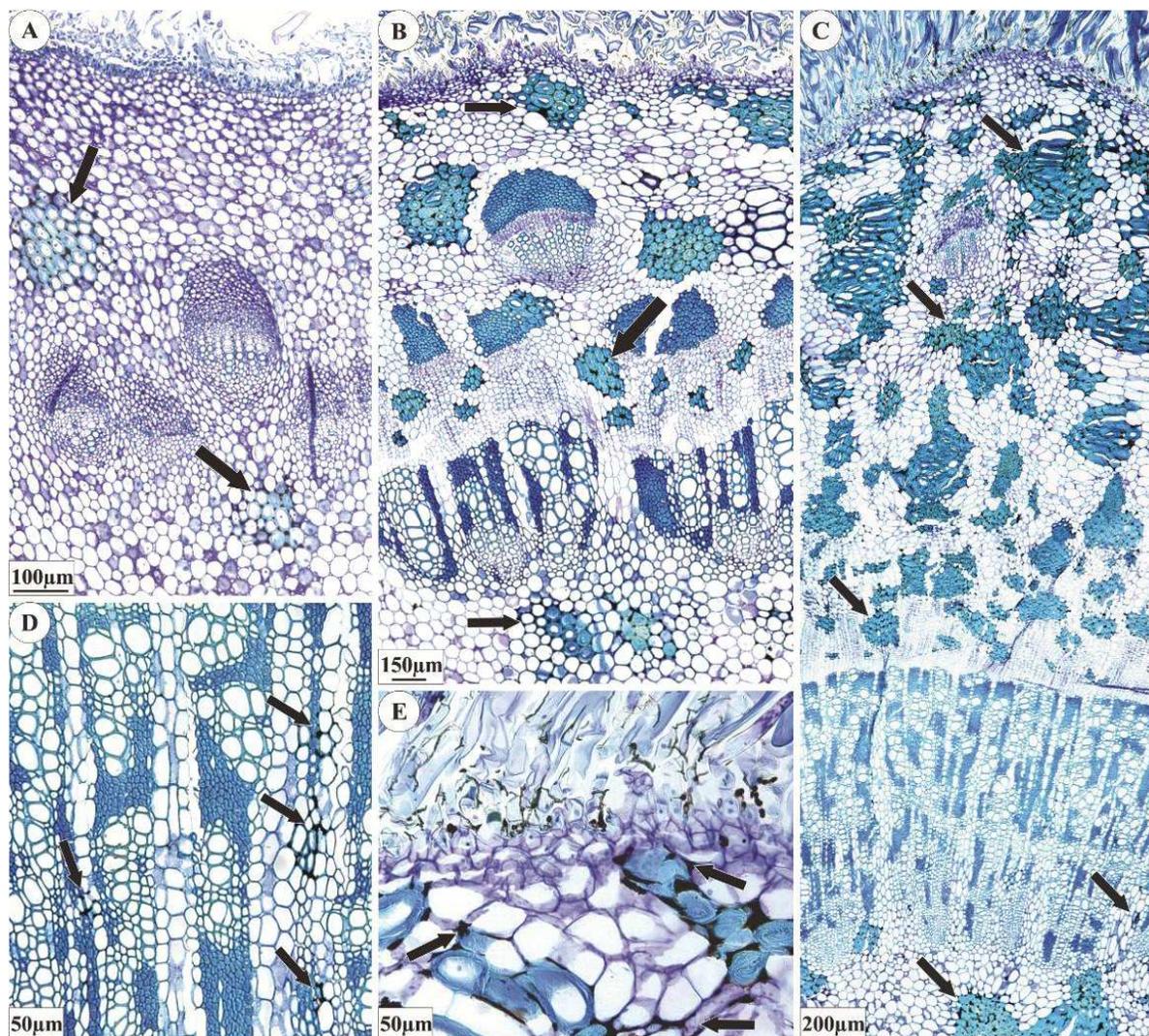


Figura 2. Ocorrência de esclereídes com fitomelanina ao longo das porções jovens e espessadas dos caules. Coloração com azul de toluidina. Secções transversais dos ramos caulinares de *Lychnophora diamantinana*. A. Porção apical do ramo caulinar apresentando grupos de esclereídes com deposições de fitomelanina no córtex e na medula (setas). B. Porção do ramo com crescimento secundário, evidenciando esclereídes com fitomelanina no floema secundário (seta maior) e novos grupos de esclereídes com fitomelanina no córtex e na medula (setas menores). C. Porção do ramo caulinar espessado apresentando esclereídes com fitomelanina no córtex, no floema e no xilema secundários, e na medula. D. Detalhe do xilema secundário com esclereídes e deposições de fitomelanina (setas). E. Detalhe da periferia do córtex, com esclereídes e deposições de fitomelanina (setas) ocorrendo próximo à epiderme.

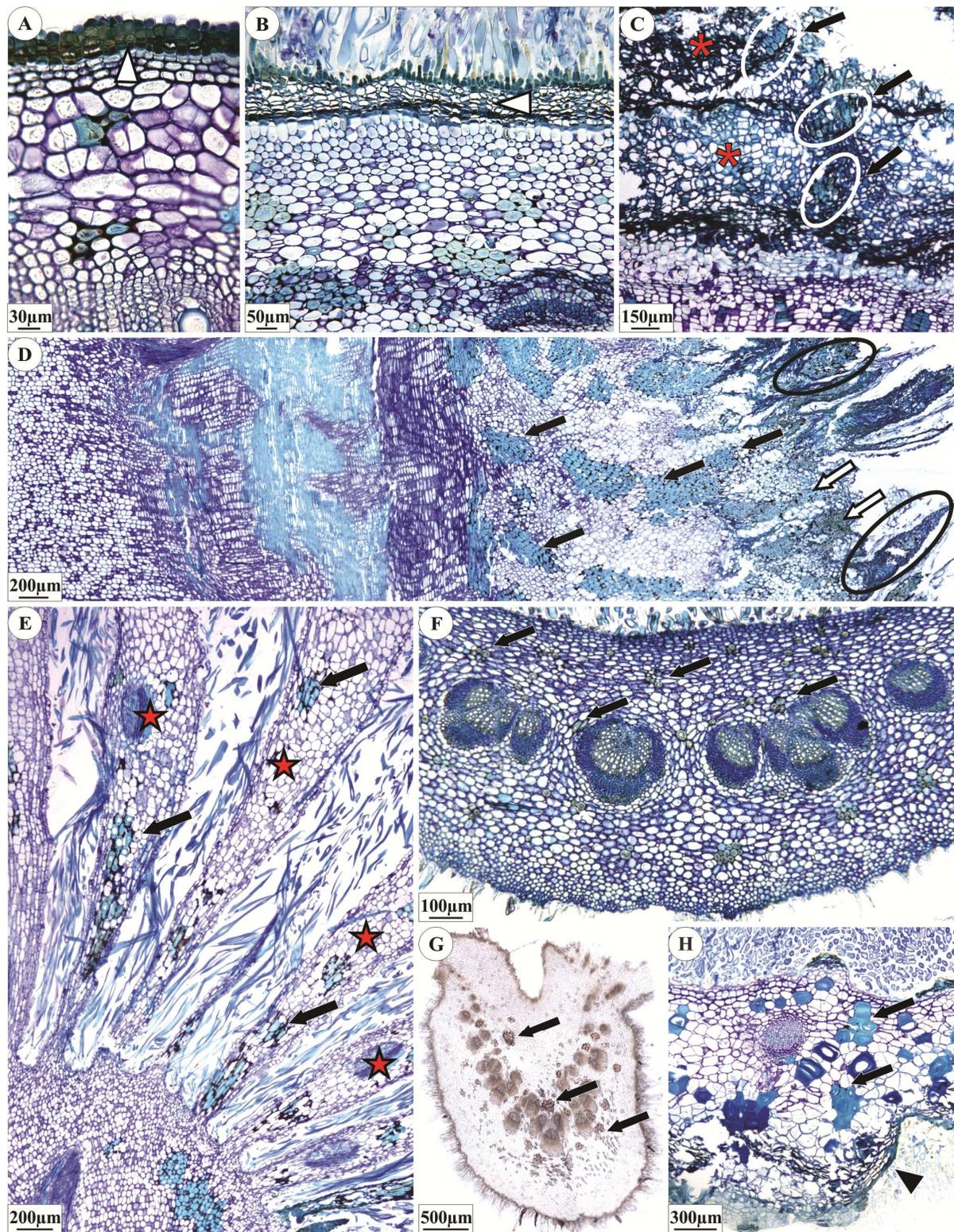


Figura 3. Formação do revestimento secundário do caule, posicionamento periférico das esclereídes com fitomelanina e sua ocorrência nas folhas. Coloração com azul de toluidina,

com exceção de G, onde o material não foi corado. Secções transversais (A-C) e longitudinais (D-E) dos caules e secções transversais de folhas (F-H). A. *Blanchetia heterotricha*. B e F. *Paralychnophora bicolor*. C. *Prestelia eriopus*. D-E. *Minasia scapigera*. G. *Paralychnophora reflexoauriculata*. H. *Lychnophora tomentosa*. A-B. Revestimento secundário com camadas suberificadas (pontas de seta negras) nas porções lenhosas dos ramos. C. Formação de múltiplas camadas suberificadas (asterisco vermelho) as quais incluem grupos de esclereídes com fitomelanina (elipses brancas e setas negras). D. Secção longitudinal de porção lenhosa do caule evidenciando esclereídes com fitomelanina associada ao floema secundário (setas negras), a sua posição periférica (setas brancas) no revestimento secundário e a presença de grupos de esclereídes com fitomelanina nas bainhas suberificadas de folhas senescentes (elipses negras). E. Porção apical caulinar com bainhas de folhas imbricadas (estrelas vermelhas) apresentando grupos de esclereídes com deposições de fitomelanina (setas). F. Bainha foliar com grupos de esclereídes ou esclereídes isoladas com deposições de fitomelanina (setas). G. Nervura central de folha com grupos de esclereídes com fitomelanina (setas). H. Bainha foliar com grupos de esclereídes ou esclereídes isoladas (setas) com menor deposição de fitomelanina e suberificação da porção voltada ao exterior (ponta de seta).

Padrões de deposição de fitomelanina

Nas espécies avaliadas observou-se diferentes padrões de deposição de fitomelanina, os quais estão relacionados à formação da esclereíde:

1) Nos tecidos primários, principalmente nos parênquimas cortical e medular dos caules (Fig. 4A) e no parênquima fundamental das folhas, a primeira fase comumente observada é o espessamento parietal (Fig. 4B), que se acentua em algumas células (Fig. 4C) através da adição de material de parede, disposto em lamelas concêntricas (Fig. 4C). Após essa diferenciação da célula parenquimática em esclereíde, se observa a deposição de fitomelanina nos espaços intercelulares delimitados por essas células (Fig. 4D). Esse padrão é muito comum em *Blanchetia*, *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Proteopsis*, *Heterocoma*, *Paralychnophora*, *Minasia*, ‘Bahian *Lychnophora*’ e *Eremanthus*.

2) Menos comumente, pode-se observar o início da deposição de fitomelanina em espaços intercelulares de células parenquimáticas corticais ou medulares ainda não diferenciadas em esclereídes (Fig.4E), as quais se espessam posteriormente à deposição (Fig. 4F-H) dando origem à esclereídes com parede secundária muito espessada. Tal modo de deposição foi observado nos clados *Lychnophora* sensu stricto (s. str.) e *Piptolepis* e no gênero *Prestelia*.

3) Nas espécies do clado Aliança *Prestelia* (com exceção de *Prestelia*) e em duas espécies de *Lychnophora* s. str. (*L. ericoides* e *L. gardneri*) o processo de formação das esclereídes corticais é diferenciado. Nesses táxons as células parenquimáticas precursoras primeiramente aumentam de tamanho para formar as primeiras esclereídes corticais (Fig. 4I). Posteriormente, as células mais externas do córtex alongam-se e dividem-se anticlinalmente (Fig. 4J), espessando-se em seguida e originando novas esclereídes de grandes dimensões (Fig. 4K). Novas divisões celulares ocorrem em todo o parênquima cortical (Fig. 4K), originando novamente esclereídes (Fig. 4L). Contudo, a deposição de fitomelanina nos espaços intercelulares delimitados por essas esclereídes corticais de grande dimensões (Fig. 4L - inset) é tardia, ou seja, ela ocorrerá posteriormente à diferenciação das esclereídes no floema secundário e na medula.

4) Nos tecidos vasculares secundários, especialmente no floema secundário, as esclereídes são visualizadas muito próximas ao câmbio vascular, ou seja, a diferenciação celular é praticamente imediata (Fig. 2B-C), sendo que a deposição de fitomelanina nos espaços intercelulares dos grupos de esclereídes é concomitante com a sua formação. Esse padrão de formação de esclereíde e deposição de fitomelanina nos tecidos vasculares secundários são comuns em todas as espécies avaliadas.

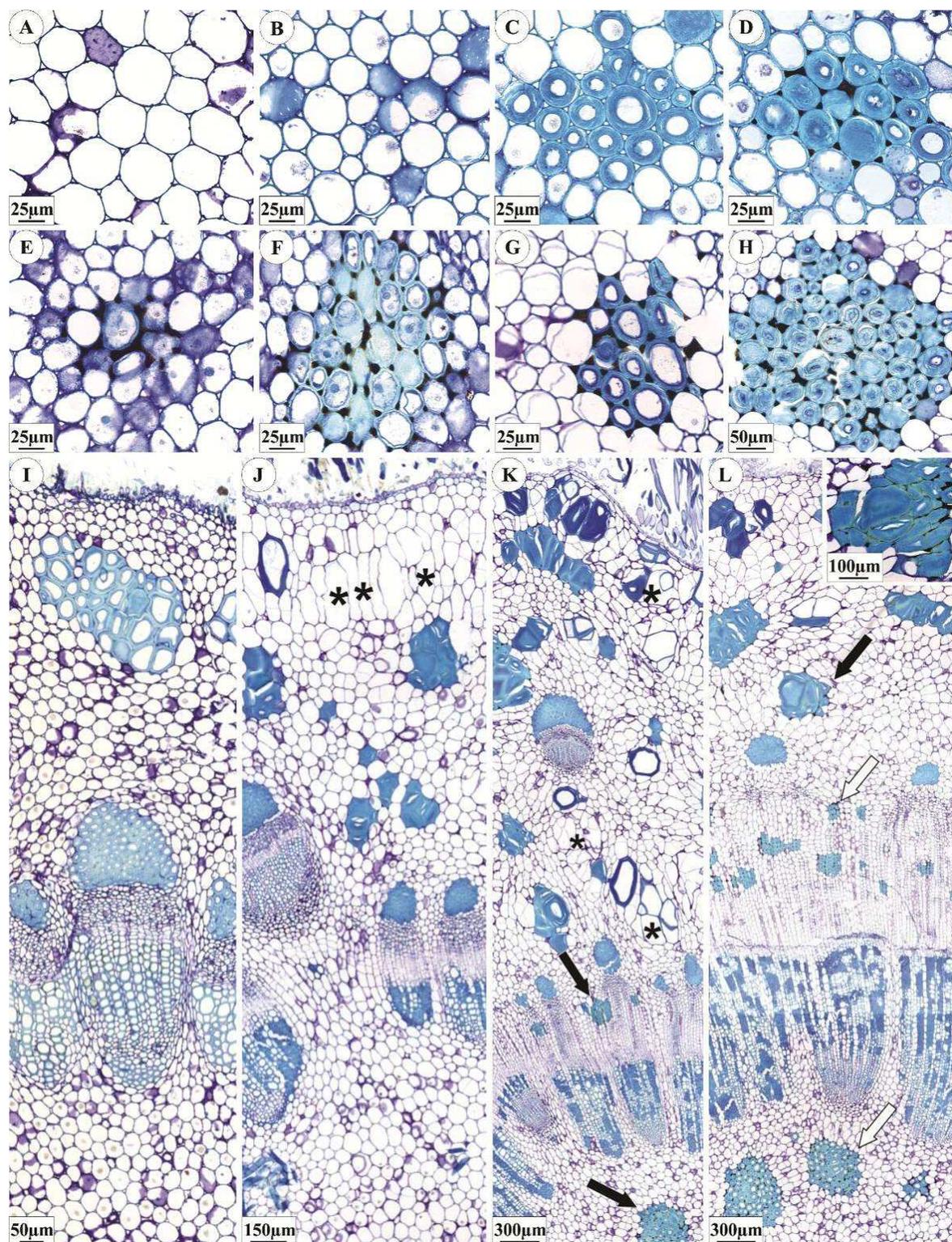


Figura 4. Padrões de formação de esclereídes e de deposição de fitomelanina nos caules de Lychnophorinae. Coloração com azul de toluidina. Secções transversais do caule de *Heterocoma gracilis* (A-D), *Lychnophora diamantinana* (E-H) e *Lychnophora tomentosa* (I-

L). A-D. Parênquima medular evidenciando o espessamento das células (A-B), posteriormente a sua esclerificação (C) e a deposição de fitomelanina nos espaços intercelulares com coloração negra (D). E-H. Parênquima cortical com deposição inicial de fitomelanina nos espaços intercelulares (E), posterior espessamento parietal das células (F-G) e esclerificação final (H). I-L. Formação das esclereídes corticais: células parenquimáticas de maior volume se esclerificam (I), células mais externas do córtex alongam-se, dividem-se anticlinalmente (asterísco em J-K) e se esclerificam (K-L) originando novas esclereídes de grandes dimensões (setas negras), as quais só então apresentam deposições de fitomelanina (inset), após a formação de esclereídes na medula e no floema secundário (setas brancas).

Reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres

As reconstruções em parcimônia dos estados ancestrais da ocorrência de fitomelanina foram realizadas sobre cada parte vegetativa da planta e, ou seus respectivos tecidos, separadamente (ou seja, parênquima cortical e medular, floema, xilema - para porções jovens e porções espessadas do caule- e bainha, pecíolo e lâminas foliares). Os caules espessados são os locais de maior ocorrência de fitomelanina entre as espécies, especialmente, na medula e no floema (Fig. 5-13, Apêndice 3). De um modo geral, as reconstruções indicam que a fitomelanina já estava presente no ancestral comum mais recente (ACMR) de *Lychnophorinae*.

Para a ocorrência de fitomelanina no floema secundário, as reconstruções indicam que o estado estava presente no ACMR e também no grupo externo (*Piptocarpha oblonga*). Nesse caso, a capacidade de formar fitomelanina no floema secundários teria sido perdida sete vezes dentro da subtribo (Fig. 8). Em relação a presença de fitomelanina na medula dos caules espessados, a maioria das reconstruções mais parcimoniosas (MPRs) indicam que o estado teria surgido uma única vez, no ACMR, provavelmente com 9 a 11 perdas (Fig. 9).

Além disso, o ACMR de Lychnophorinae, não apresentava fitomelanina no córtex e no xilema secundário do caule espessado (Fig. 8 e 9), nem em quaisquer tecidos das porções jovens do caule (Fig. 6 e 7), ou em partes da folha (Fig. 10).

As reconstruções indicam que ao longo da evolução da subtribo, nas porções jovens dos ramos (Fig. 6 e 7), a fitomelanina teria surgido no córtex 11 a 14 vezes; na medula 13 a 16 vezes, tendo sido perdida ao menos duas vezes; no floema primário, a fitomelanina teria surgido quatro vezes; e no xilema primário, uma única vez.

Em relação às partes da folha (Fig. 10), a fitomelanina é amplamente encontrada nas bainhas (Fig. 5). Devido a ambiguidades nos nós próximos às raízes das linhagens principais existem várias hipóteses para o surgimento da fitomelanina nas folhas. A maioria das MPRs indica que teriam ocorrido três a cinco aquisições para presença de fitomelanina nas bainhas foliares. Nos pecíolos, podem ter ocorrido seis ou sete aquisições. Na lâmina foliar, a fitomelanina teria surgido três ou quatro vezes.

Quando os tecidos foram considerados conjuntamente para cada parte vegetativa aérea (Fig. 11), as reconstruções indicam que a fitomelanina já estava presente no caule espessado do grupo externo *Piptocarpha oblonga*, apresentando apenas três perdas em Lychnophorinae. Para as porções jovens do caule e partes da folhas, existem ambiguidades nos nós próximos às raízes das linhagens, determinando várias hipóteses. Assim, a fitomelanina pode ter surgido 16 ou 17 vezes nas porções jovens do caule; e na folha, 11 ou 12 vezes.

Embora a ocorrência de fitomelanina no floema secundário seja uma característica comum para todos os hábitos, nos tecidos primários do caule nem todas as espécies apresentam fitomelanina. Assim, levando em consideração a hipótese de que a fitomelanina

poderia apresentar um papel de proteção contra agentes externos diversos, comparou-se a sua ocorrência nas porções jovens do caule com os hábitos exibidos pelas espécies de Lychnophorinae (Fig. 12). É possível constatar que a ocorrência de esclereídes com fitomelanina nos tecidos primários de ramos caulinares coincide com indivíduos que na sua maioria são árvores e arvoretas. Esses apresentam os tecidos primários por mais tempo e conseqüentemente, em maiores extensões dos ramos. Além disso, observou-se que a fitomelanina tende a estar presente na periferia dos caules, tanto em espécies caulirosuladas e arbustivas, como em arvoretas e árvores.

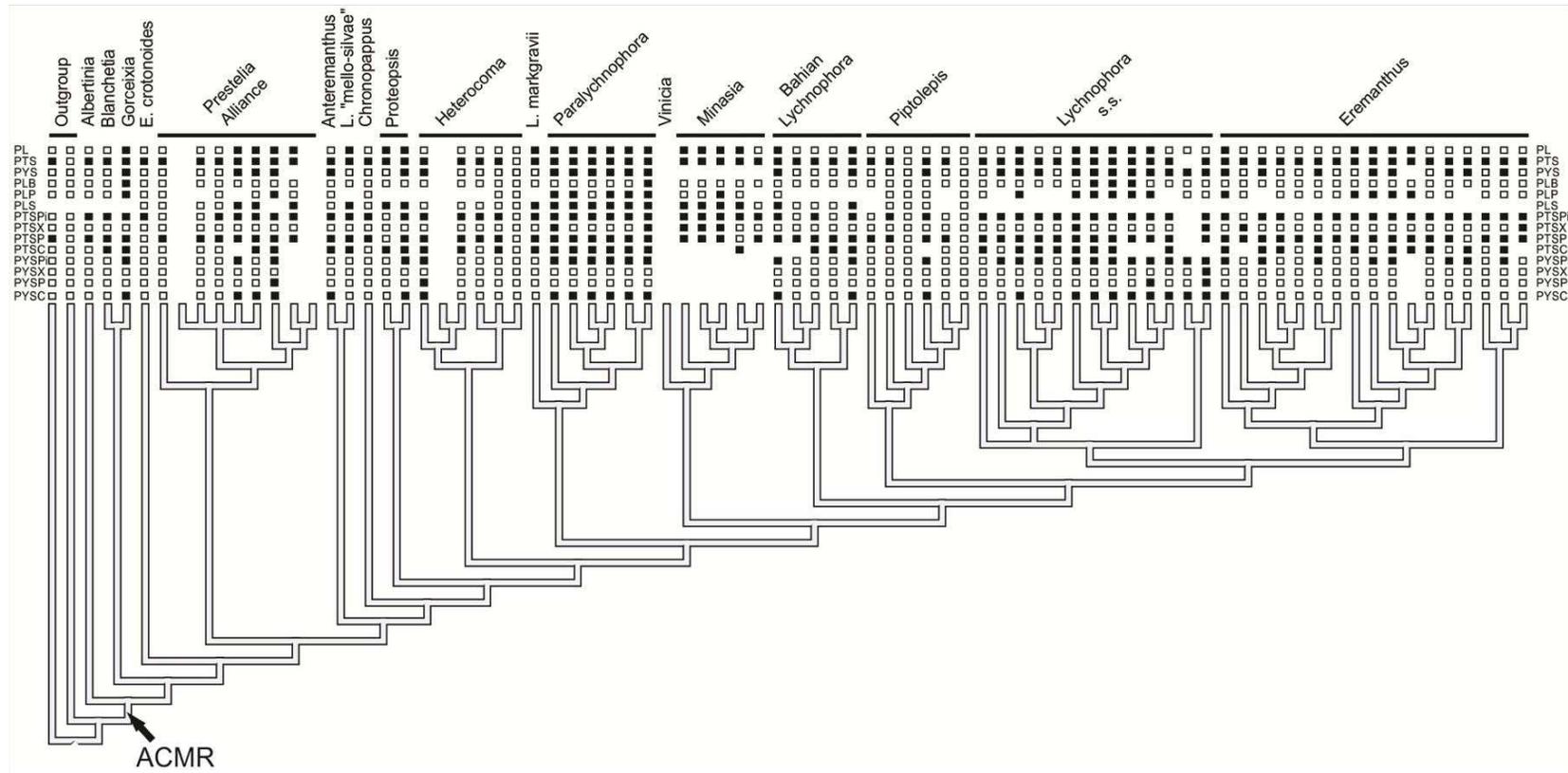


Figura 5. Cladograma da distribuição de fitomelanina nos tecidos e órgãos de Lychnophorinae. Os nomes das espécies foram substituídos pelos nomes dos gêneros ou dos clados a que pertencem. Os códigos nas laterais representam os locais de ocorrência da fitomelanina: PYSC = no córtex do ramo caulinar jovem; PYSP = no floema do ramo caulinar jovem; PYSX = no xilema do ramo caulinar jovem; PYSPi = na medula do ramo caulinar jovem; PTSC = no córtex do caule espessado; PTSP = no floema secundário do caule espessado; PTSX = no xilema secundário do caule espessado; PTSPi = na medula do caule espessado; PLS = na bainha foliar; PLP = no pecíolo foliar; PLB = na lâmina foliar; PYS = no ramo caulinar jovem; PTS = no caule espessado; PL = na folha. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

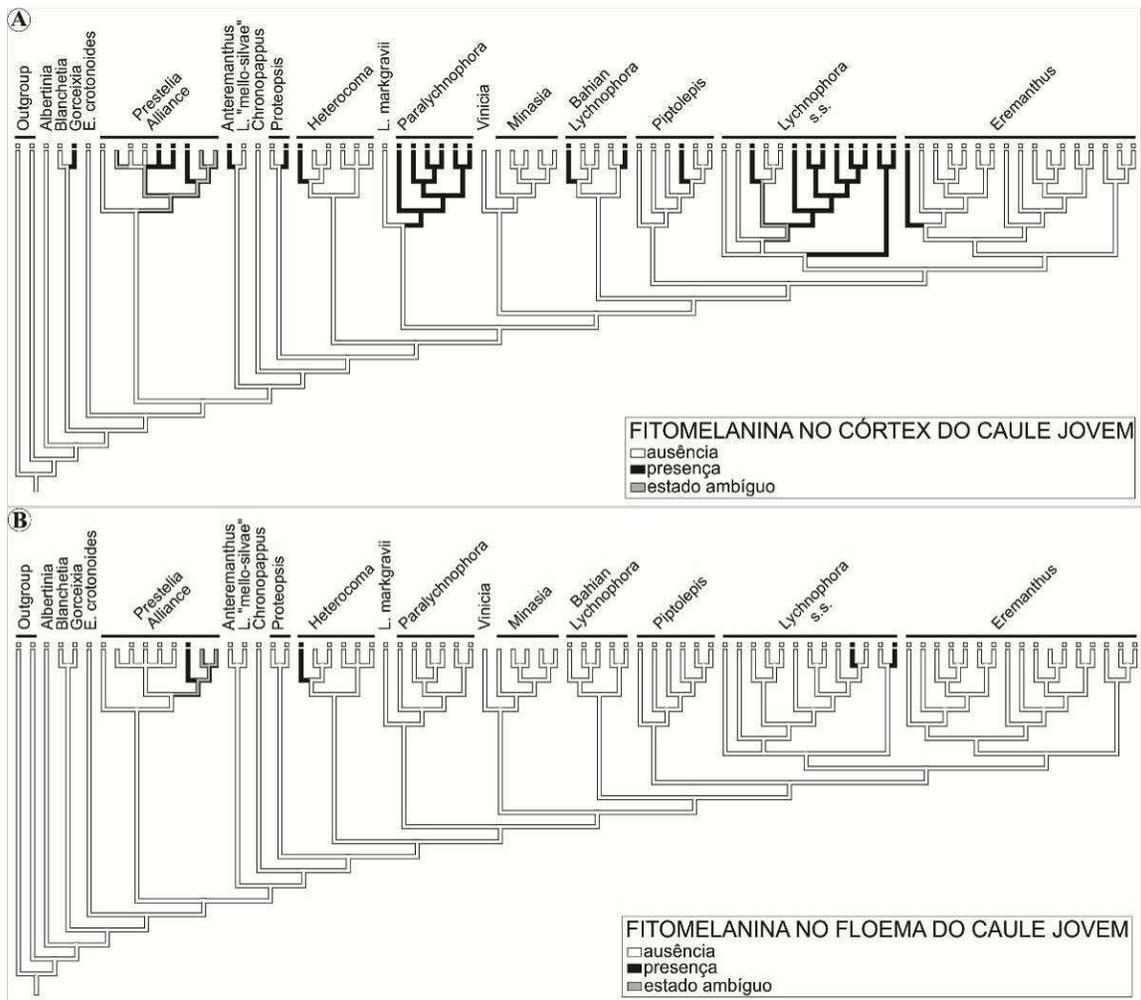


Figura 6. Reconstruções dos estados ancestrais de carácter para a ocorrência de fitomelanina nos ramos caulinares jovens de Lychnophorinae, nas seguintes regiões: A. Córtex. B. Floema primário.

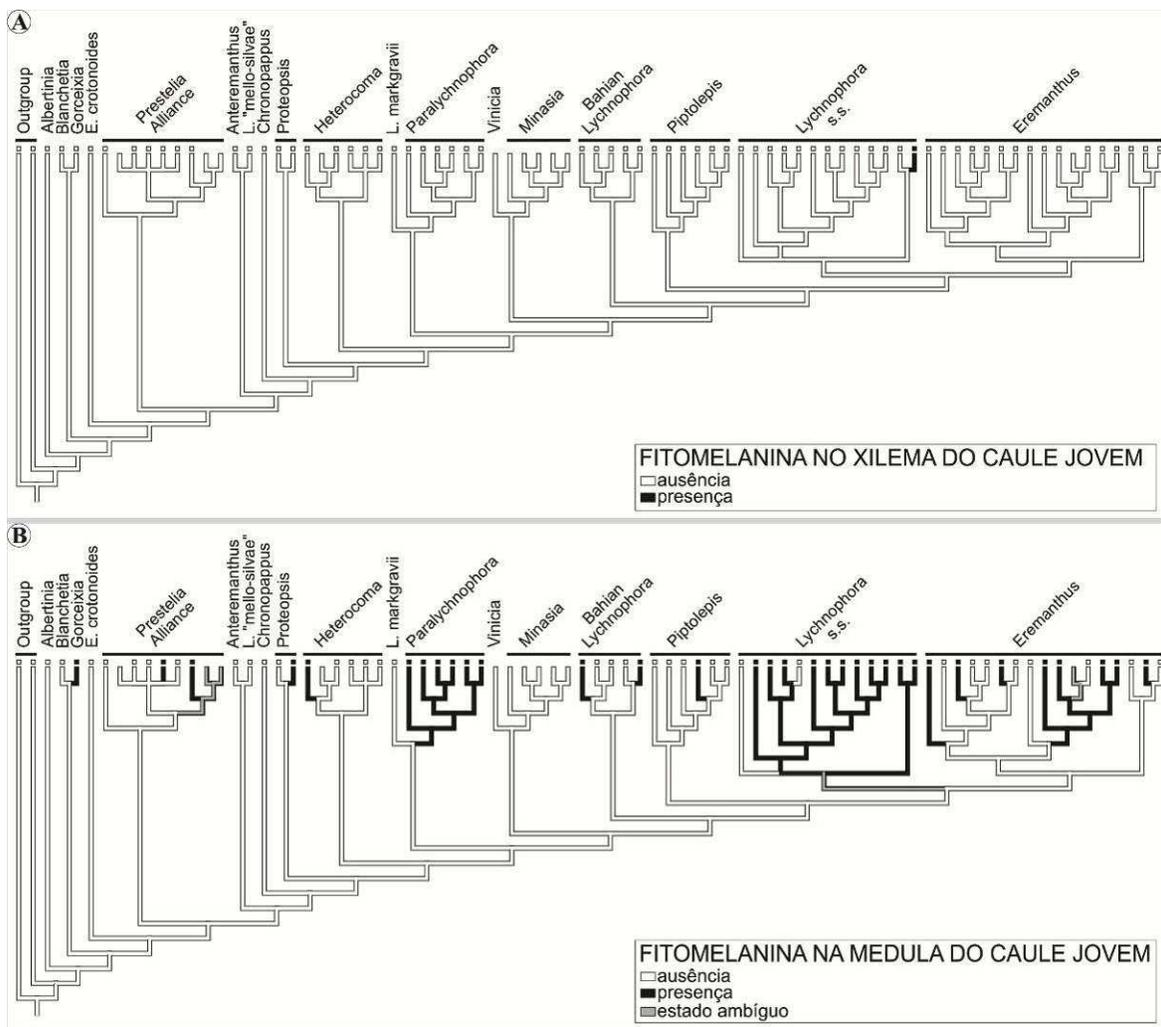


Figura 7. Reconstruções dos estados ancestrais de carácter para a ocorrência de fitomelanina nos ramos caulinares jovens de Lychnophorinae, nas seguintes regiões: A. Xilema primário. B. Medula.

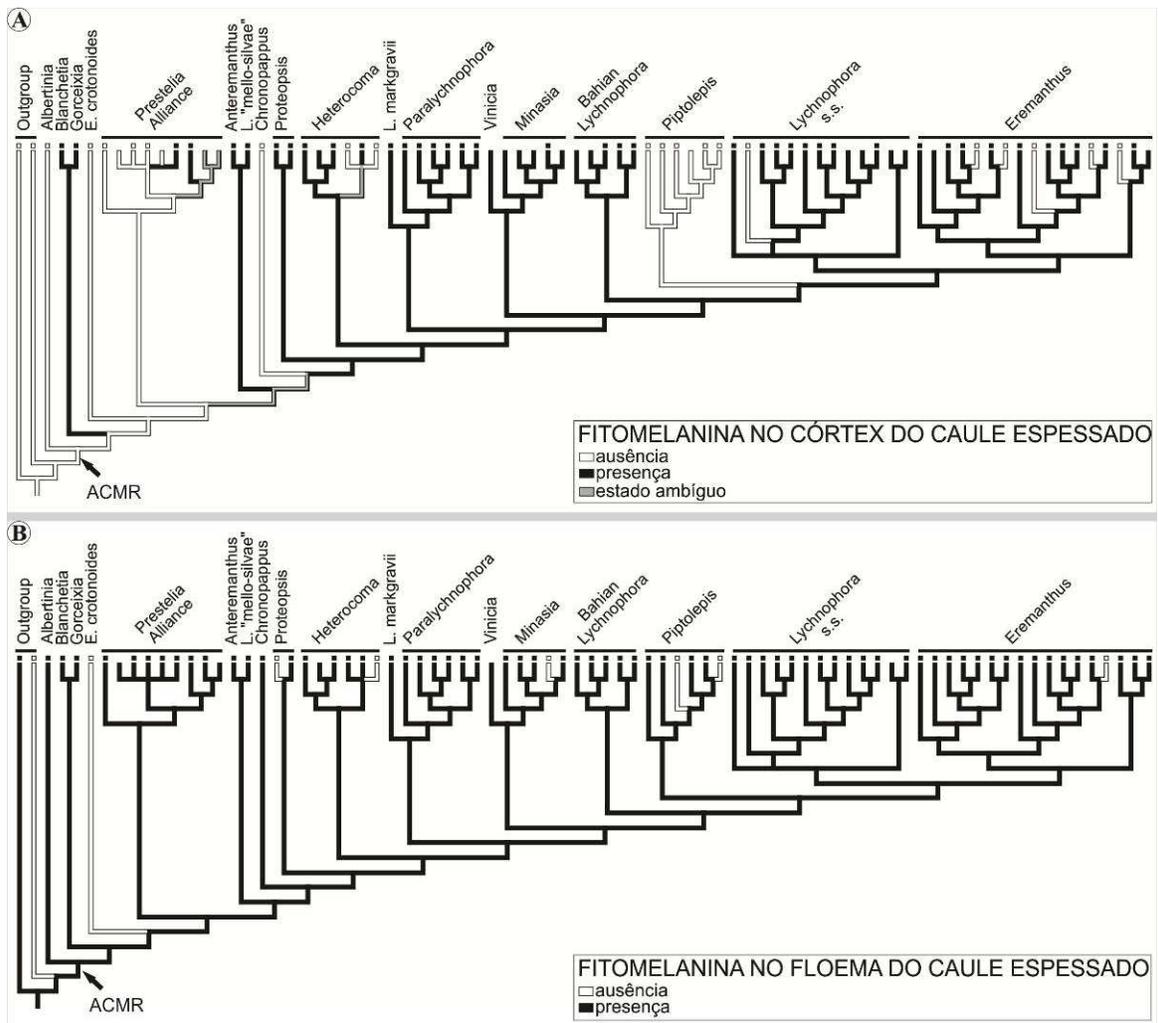


Figura 8. Reconstruções dos estados ancestrais de carácter para a ocorrência de fitomelanina nos caules espessados de Lychnophorinae, nas seguintes regiões: A. Córtex. B. Floema secundário. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

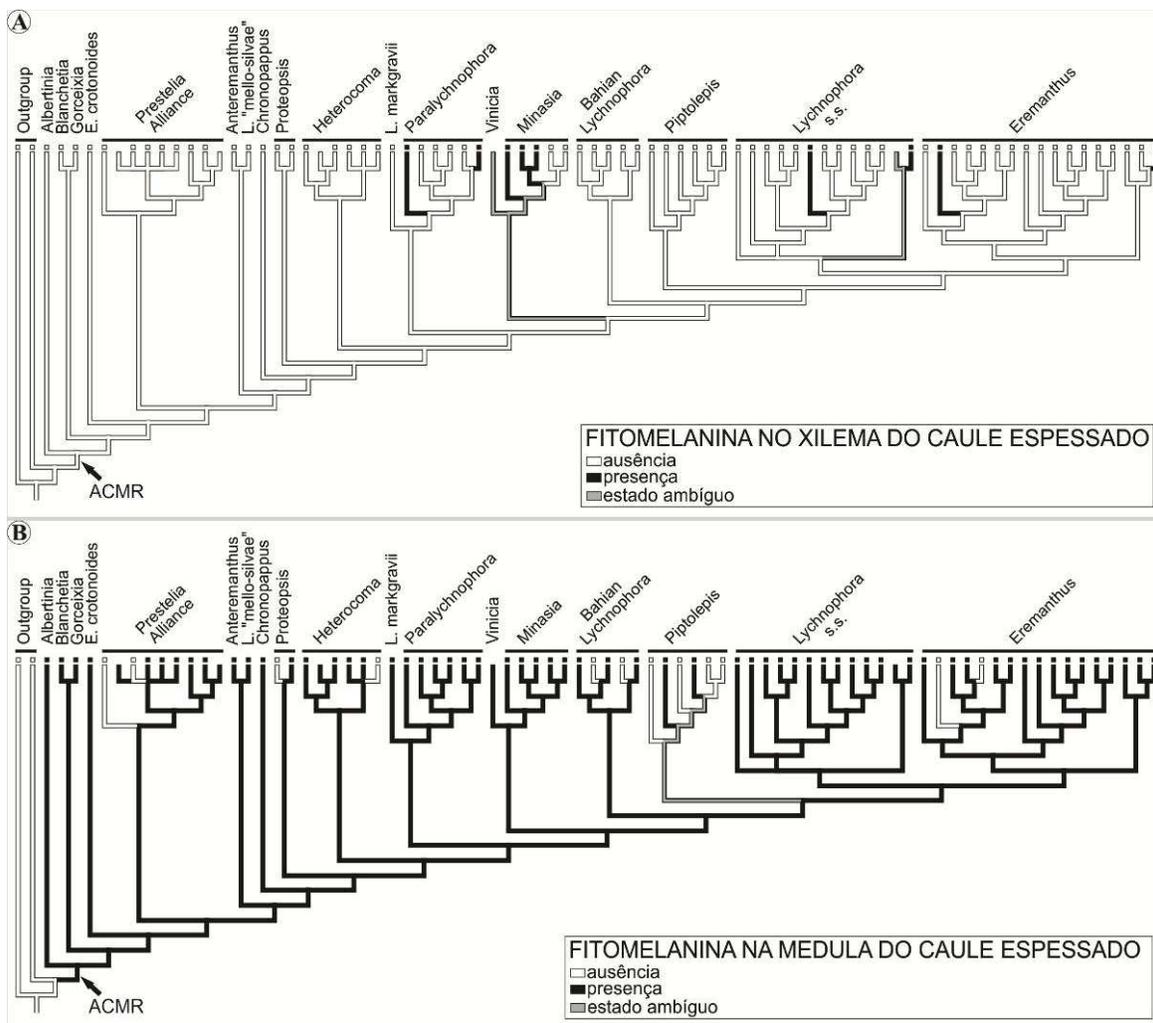


Figura 9. Reconstruções dos estados ancestrais de carácter para a ocorrência de fitomelanina nos caules espessados de Lychnophorinae, nas seguintes regiões: A. Xilema secundário. B. Medula. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

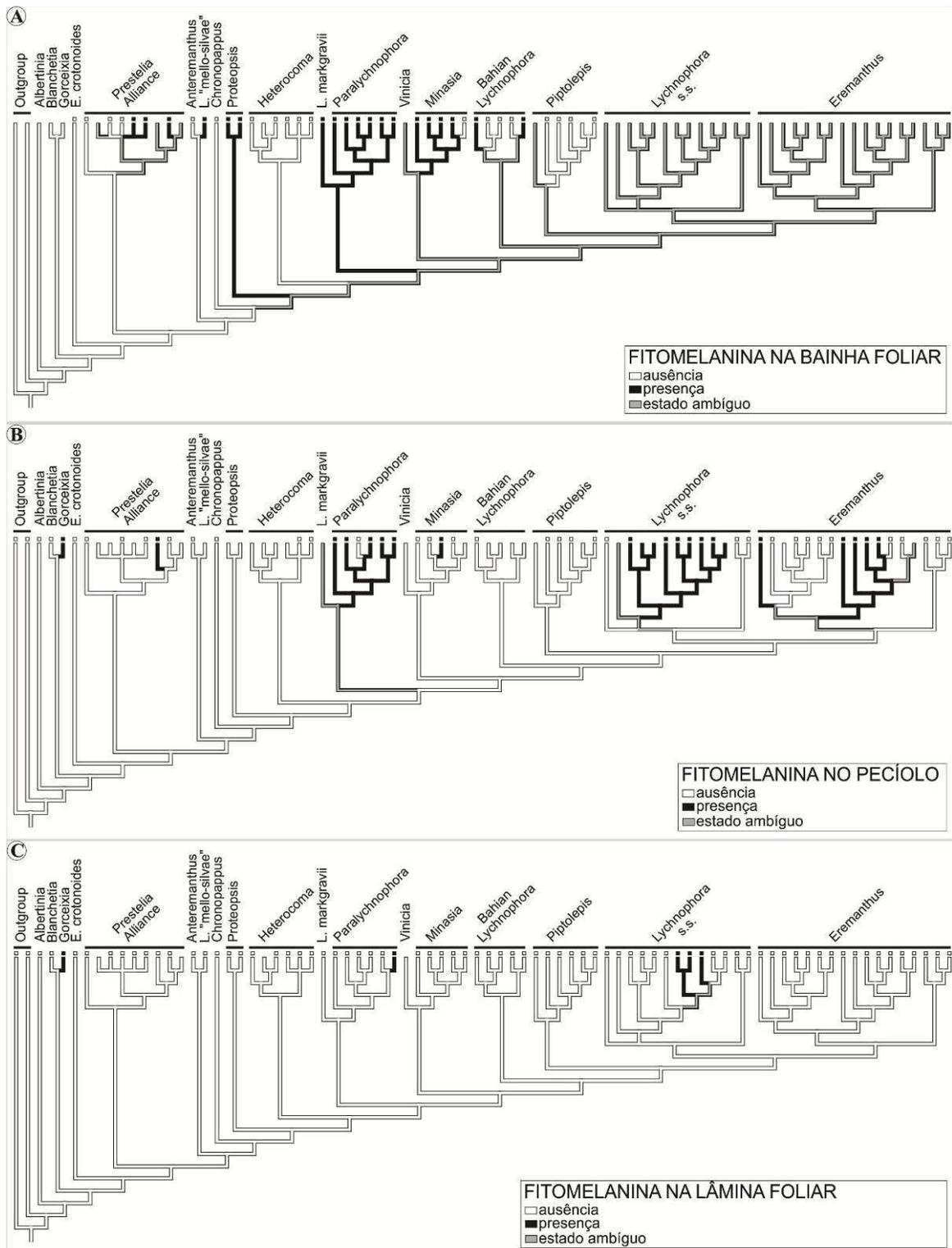


Figura 10. Reconstruções dos estados ancestrais de caracter para a ocorrência de fitomelanina nas folhas de Lychnophorinae, nas seguintes partes: A. Bainha. B. Pecíolo. C. Lâmina.

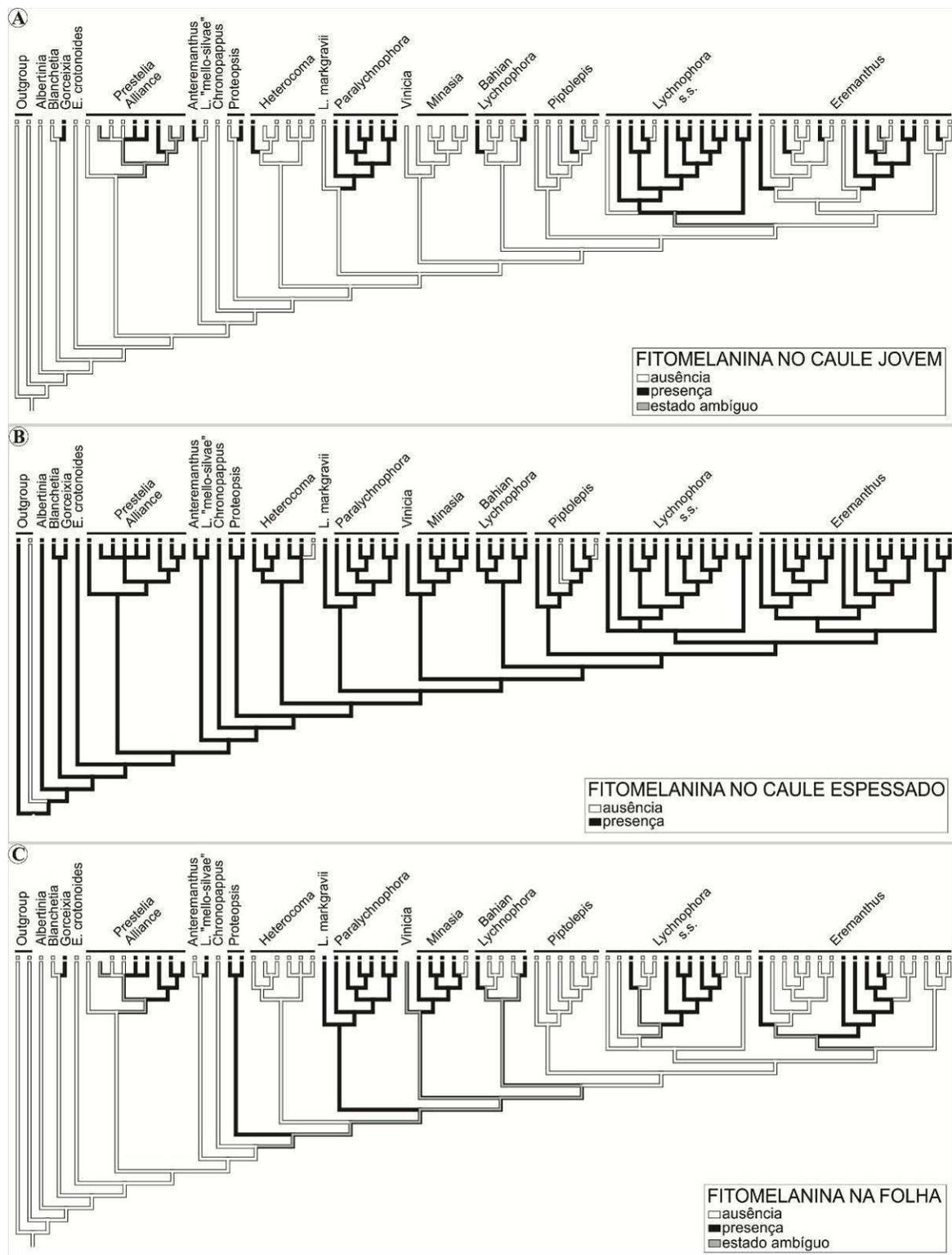


Figura 11. Reconstruções dos estados ancestrais de carácter para a ocorrência de fitomelanina nos diferentes órgãos vegetativos aéreos de Lychnophorinae: A. Ramos caulinares jovens. B. Caules espessados. C. Folha.

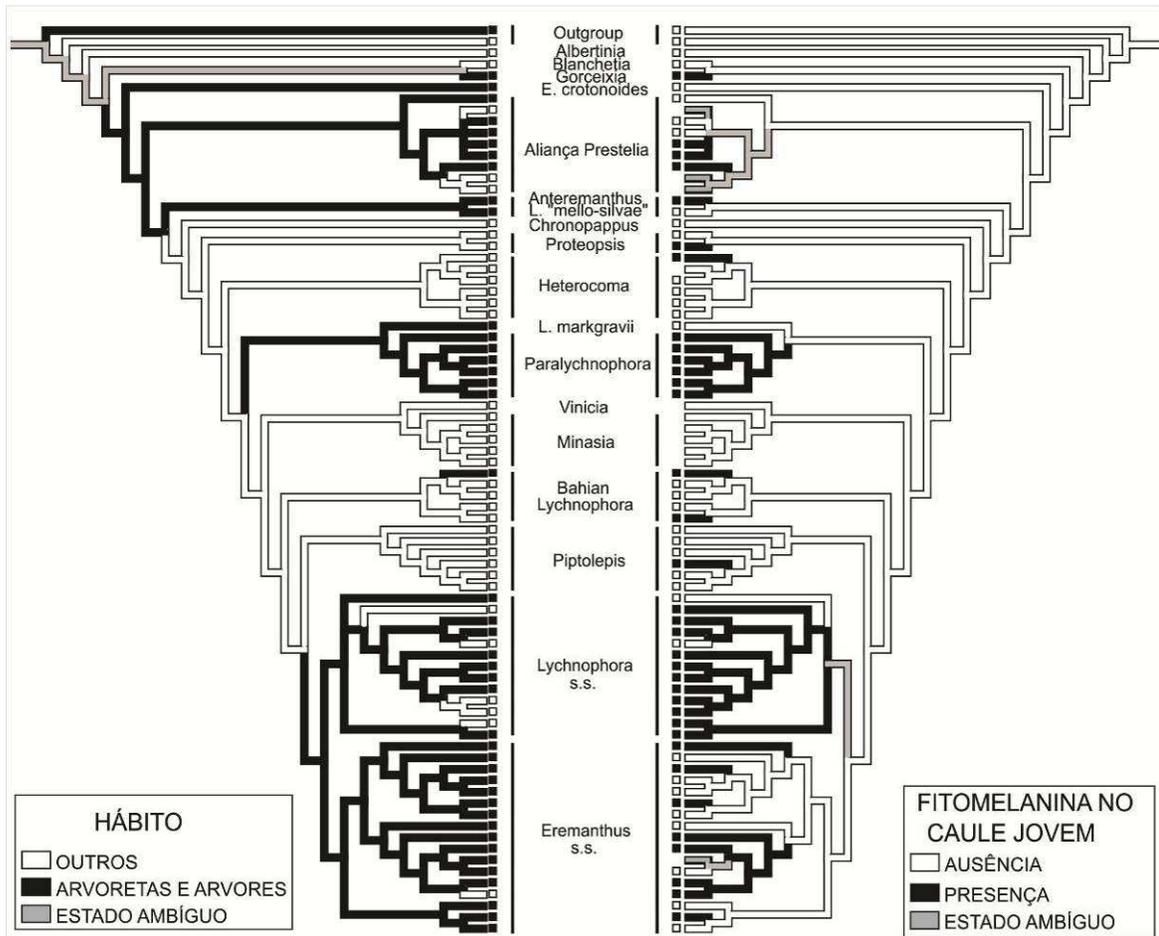


Figura 12. Cladogramas em espelho representando a relação do hábito com a ocorrência de fitomelanina nas porções jovens dos ramos caulinares (parcimônia). Notar a predominância de fitomelanina nas porções jovens do caule de espécies que são arvoretas ou árvores.

Em relação às folhas, observou-se que a parte foliar com a maior ocorrência de fitomelanina entre as espécies foi a bainha. Nesse caso, comparou-se os tipos de bainha visualizados em Lychnophorinae com a presença de fitomelanina nessas estruturas (Fig. 13). Nota-se que, para a maioria dos terminais que apresentam fitomelanina nas bainhas, essas estruturas foliares são dos tipos amplexicaule e semi-amplexicaule. Em Lychnophorinae esses tipos de bainha geralmente permanecem aderidos ao caule, mesmo após a senescência foliar.

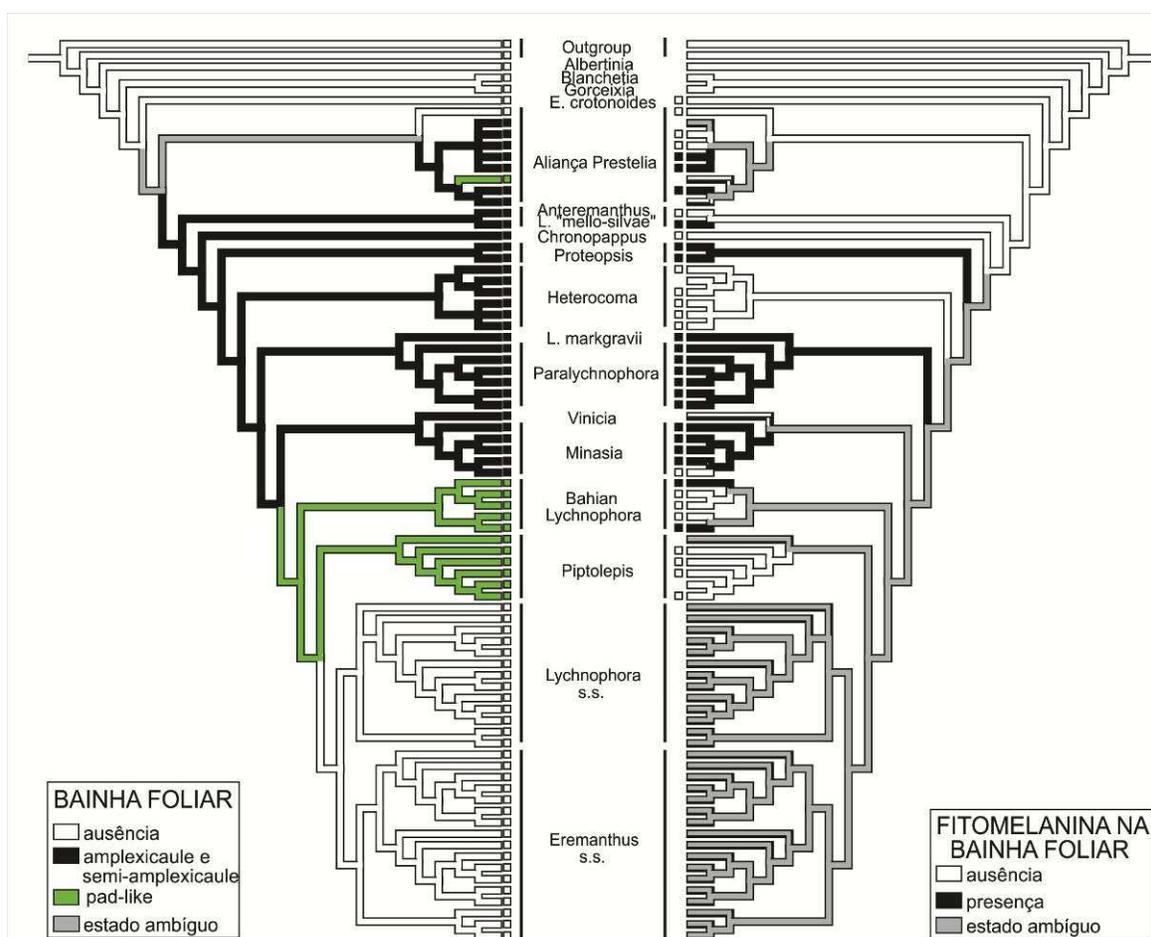


Figura 13. Cladogramas em espelho representando a relação dos tipos de bainhas com a ocorrência de fitomelanina nas bainhas das folhas (parcimônia). Notar predominância de fitomelanina em bainhas dos tipos amplexicaule e semiamplexicaule, as quais permanecem aderidas ao caule após a senescência foliar.

DISCUSSÃO

Caracterização da fitomelanina em órgãos aéreos

A fitomelanina nos caules aéreos e folhas de Lychnophorinae apresenta as mesmas características descritas na literatura para cipselas de espécies de Heliantheae e Eupatorieae - Asteraceae (Pandey *et al.*, 1989, Pandey e Dhakal, 2001; Marzinek *et al.*, 2008; Marzinek e Oliveira, 2010; De-Paula *et al.*, 2013) e Vernonieae (Loeuille *et al.* 2013). A sua coloração e os tipos celulares associados também se assemelham muito às observações realizadas para raízes e rizomas de espécies de Heliantheae (Upton *et al.*, 2011) e de Cardueae (Fritz e Saukel, 2011). Diferentemente, em Lychnophorinae, a deposição de fitomelanina ocorre nos órgãos vegetativos aéreos.

A deposição de fitomelanina nos espaços intercelulares formados entre esclereídes e, ou células parenquimáticas também foi observada por Fritz e Saukel (2011) e Upton *et al.* (2011) em raízes e rizomas. Nas cipselas de Asteraceae, a fitomelanina é comumente encontrada nos espaços intercelulares esquizógenos formados entre a hipoderme e a camada de fibras subjacente (Marzinek *et al.*, 2008; Marzinek e Oliveira, 2010; Pandey e Dakal, 2011; De-Paula *et al.*, 2013). Assim, independentemente do órgão de ocorrência da fitomelanina em espécies de Asteraceae, a sua deposição em espaços intercelulares parece ser uma característica comum à família e poderia constituir uma sinapomorfia para a família. Essa localização é diferente daquela relatada em Asparagales por Wittich e Graven (1995, 1998), onde a fitomelanina ocorre no interior das células epidérmicas do tegumento externo das sementes, entre a membrana plasmática e a parede celular.

Embora em Asparagales a origem da fitomelanina esteja aparentemente desvendada - sendo relacionada à deposição e dissolução de calose e à participação de compostos fenólicos, ocorrendo no interior da célula (Wittich e Graven, 1995, 1998) - em Asteraceae a sua origem, do ponto de vista estrutural e químico, ainda é controversa. Algumas hipóteses de origem estrutural são: degradação de fibras (Knowles, 1978), de células hipodérmicas (Rogers *et al.*, 1982), secreção pela hipoderme (Pandey e Singh, 1983; Pandey *et al.*, 1989; Pandey, 1998) e ainda, secreção por fibras (De-Paula *et al.*, 2013). Além disso, Pandey *et al.* (1989), Pandey (1998) e De-Paula *et al.* (2013) sugerem que os precursores da fitomelanina sejam liberados nos espaços intercelulares juntamente com enzimas que os polimerizam. De acordo com os autores, tais precursores e enzimas seriam oriundos de tipos celulares diferentes, ou seja, os precursores viriam da hipoderme e as enzimas das fibras (Pandey *et al.*, 1989; Pandey, 1998), ou vice-e-versa (De-Paula *et al.*, 2013). Essas observações e hipóteses foram sugeridas para cipselas de Heliantheae e Eupatorieae. Nos caules aéreos e folhas de Lychnophorinae não foi observada degradação celular e as esclereídes e células parenquimáticas que parecem estar envolvidas na síntese de fitomelanina.

Nos caules e folhas analisados, a fitomelanina, ou os seus precursores, parecem ser sintetizados nas esclereídes ou em células parenquimáticas adjacentes, que, em geral, se diferenciam posteriormente em esclereídes, sendo polimerizados nos espaços intercelulares. Essa hipótese é sugerida pela relação espacial direta observada entre a fitomelanina e esses tipos celulares. Contudo, estudos de microscopia eletrônica de transmissão, como o realizado em cipselas de *Praxelis diffusa* (Eupatorieae) por De-Paula *et al.* (2013) e estudos químicos seriam necessários para elucidar as organelas envolvidas na síntese celular e a origem química da fitomelanina em caules e folhas de Lychnophorinae.

Devido à natureza química complexa da melanina, que apresenta estrutura altamente irregular e resistência à degradação química, com dificuldade de extração por solventes, ela tem se mostrado difícil de ser desvendada (Thomson, 1976; Pandey e Dhakal, 2001). De acordo com Pandey e Dhakal (2001), existem muitas especulações sobre a origem química da fitomelanina e as hipóteses incluem: processos de desidratação a partir de carboidratos, acúmulo de substâncias lipídicas que se polimerizam de modo semelhante a acetilenos altamente insaturados, secreção de gotículas semelhante à resinas carbonizadas, ou ainda com origem a partir de álcool-polivinil. Além disso, os estudos de Nikolaus (1968), que nomeiam as fitomelaninas como catecol-melaninas, indicam a presença do composto fenólico catecol conjugado. O mesmo é relatado por Thomson (1976) que reafirma que as melaninas são produtos de alto peso molecular formadas pela oxidação enzimática de fenóis. No presente estudo, testes histoquímicos preliminares não foram capazes de identificar qualquer classe química, pela natureza inerte da fitomelanina e pelas razões citadas anteriormente e, embora os trabalhos de Wittich e Graven (1995, 1998) indiquem a provável participação da calose (um carboidrato) e de compostos fenólicos na síntese de fitomelanina em Asparagales, em Asteraceae as substâncias envolvidas na síntese da fitomelanina ainda são desconhecidas. A elucidação dos grupos químicos envolvidos na síntese da fitomelanina pode contribuir de maneira ímpar ao estudo dos grupos de plantas em que o pigmento ocorre, pois poderia indicar os reais mecanismos celulares envolvidos na síntese, ou seja, quais organelas participam do processo e dessa forma, apontar os tipos celulares responsáveis pela formação da fitomelanina.

Distribuição da fitomelanina nos tecidos e hipóteses adaptativas

As prováveis funções relacionadas à fitomelanina das sementes e cipselas indicadas na literatura, levam em conta a proteção contra herbivoria, contra a invasão fúngica e microbiana, contra a desidratação e contra a radiação solar intensa (Pandey et al., 1989; Wittich e Graven, 1995; Pandey e Dhakal, 2001; Jeffrey, 2009). No presente estudo, conforme previamente explicitado, nós observamos que as esclereídes envoltas por fitomelanina se diferenciam nas porções periféricas dos caules ao longo do desenvolvimento do indivíduo. A ocorrência no córtex de porções caulinares jovens está principalmente relacionada a indivíduos arbóreos (árvores e arvoretas), cujos tecidos primários se mantêm por maiores extensões caulinares. A ocorrência de fitomelanina no floema secundário das porções caulinares espessadas é amplamente observada nas espécies da subtribo, abrangendo todos os tipos de hábitos. Nessas regiões periféricas as esclereídes envoltas por fitomelanina poderiam exercer proteção contra diversos agentes externos, como aqueles citados na literatura para as sementes e cipselas. O fato de a fitomelanina ser um polímero mecanicamente duro (Wittich e Graven, 1995; Pandey e Dhakal, 2001) somado à sua aposição a esclereídes - que são células mecanicamente muito resistentes devido à sua composição parietal - sugere um possível papel protetor contra herbivoria, relacionado à palatabilidade e também à penetração do aparelho bucal de insetos, os quais seriam dificultados.

O revestimento secundário do caule é um súber estratificado como descrito em espécies de *Aldama* (Asteraceae) (Silva et al., 2014), sendo que, nas regiões mais basais dos caules espessados, as múltiplas camadas de células suberificadas, incluindo o floema secundário e grupos de esclereídes com fitomelanina formam uma estrutura similar ao

ritidoma. Machado *et al.* (2005) e Alonso e Machado (2008) associam a presença de grandes quantidades de esclereídes dispersas no ritidoma com a proteção dos tecidos internos. Em Lychnophorinae, a presença das camadas suberizadas intercaladas com esclereídes envoltas por fitomelanina poderia exercer uma proteção conspícua aos indivíduos de Lychnophorinae, especialmente aos tecidos vasculares dos caules. A ocorrência de fitomelanina nas bainhas que permanecem aderidas ao caule após a senescência foliar, assim como a suberificação das camadas mais externas dessas bainhas, reforçam a hipótese de proteção.

Padrões evolutivos da fitomelanina

A reconstrução do estado ancestral da presença de fitomelanina nos tecidos, indica que a fitomelanina ocorreu nas porções mais espessadas ou lenhosas do caule no ancestral mais recente das Lychnophorinae. Contudo a fitomelanina presente nos caules parece ter sido originada em Vernoniae anteriormente às Lychnophorinae, já que o grupo externo *Piptocarpha oblonga* apresenta fitomelanina no floema secundário da porção espessada do caule. Da mesma maneira, os trabalhos de Fritz e Saukel (2011) e Upton *et al.* (2011) indicam a presença de fitomelanina em caules subterrâneos (rizomas) e raízes de espécies da tribo Cardueae, distribuídos nos tecidos de forma muito semelhante àquela observada em Lychnophorinae (Vernoniae).

A ocorrência de fitomelanina nas porções jovens do caule acontece preponderantemente nas espécies que apresentam o hábito de arvoretas ou árvores, cujos ramos mais apicais conservam o crescimento primário por mais tempo. De acordo com a hipótese filogenética atual de Lychnophorinae (Loeuille 2011.), a evolução do hábito parece

ter ocorrido de forma independente, ou seja, as diferentes formas de vida teriam surgido várias vezes. Assim, a ocorrência de fitomelanina nas porções jovens dos caules, também teria acompanhado a mesma tendência.

Nas folhas, a ocorrência de fitomelanina é predominante nas bainhas foliares em relação ao limbo e ao pecíolo. A reconstrução dos estados ancestrais da presença de fitomelanina na bainha foliar sugere que a mesma evoluiu de forma convergente e indica a sua relação com bainhas amplexicaules e semi-amplexicaules, as quais geralmente permanecem aderidas aos caules, mesmo após a senescência foliar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A deposição de fitomelanina em *Lychnophorinae* está frequentemente associada às esclereídes, ocorrendo em espaços intercelulares. De um modo geral, as porções espessadas dos caules são os locais de maior ocorrência de fitomelanina, principalmente no floema secundário, mas todos os tecidos dos caules, jovens ou espessados, podem apresentar fitomelanina. Da mesma maneira, todas as partes da folha (bainha, pecíolo e lâmina) podem apresentar fitomelanina, mas a bainha é a estrutura que apresenta a maior ocorrência dessa substância entre as espécies. A ocorrência de fitomelanina nesses órgãos pode estar relacionada com a proteção física (dureza) e química (toxicidade) dos caules e folhas a predadores, como já verificada em cipselas de *Asteraceae*.

As investigações evolutivas realizadas no presente trabalho sugerem que o ancestral comum mais recente das *Lychnophorinae* apresentava fitomelanina no floema secundário e na medula do caule espessado. Nas demais regiões dos caules e nas folhas de *Lychnophorinae*,

a fitomelanina teria surgido posteriormente, ao longo da evolução do grupo, predominantemente de forma independente, ou seja, como convergências adaptativas.

Dessa maneira, nesse estudo nós demonstramos pela primeira vez a presença de fitomelanina em órgãos vegetativos aéreos, contribuindo com novidades para o conhecimento da fitomelanina entre as Asteraceae. Por outro lado, a ocorrência dessa substância no floema secundário do grupo externo analisado (*Piptocarpha oblonga*) sinaliza que ainda há um vasto campo de investigação a ser explorado futuramente, a cerca da ocorrência da fitomelanina em órgãos vegetativos de Vernoniae e de toda a família Asteraceae, cujas informações poderiam auxiliar no entendimento evolutivo desta tribo e desta família tão complexas.

DADOS SUPLEMENTARES

Dados suplementares consistem no seguinte: Apêndice 1. Espécies de Lychnophorinae utilizadas e os respectivos vouchers. Apêndice 2. Espécies de Lychnophorinae com estudo estrutural completo das folhas e caules. Apêndice 3. Ocorrência da fitomelanina nas espécies avaliadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcorn SM, Ark PA. 1953. Softening paraffin-embedded plant tissues. *Stain Technology* **28**: 55-56.

Alonso AA, Machado SR. 2008. Stem protective tissue in *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae), a fire tolerant species from cerrado. *IAWA Journal* **29**: 69–77.

De-Paula OC, Marzinek, J, Oliveira, DMT, Machado, SR. 2013. The role of fibres and the hypodermis in Compositae melanin secretion. *Micron* **44**: 312-316.

Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009. Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171-189.

Fritz E, Saukel J. 2011. Secretory structures of subterranean organs of some species of the Cardueae and their diagnostic value. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica* **53**: 62-72.

Jeffrey C. 2009. Evolution of Compositae flowers. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae. Michigan, Sheridan Books, 131-138.

Karnovsky MJ. 1965. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of cell Biology* **27**: 137a-138a.

Knowles PE. 1978. *Morphology and anatomy*. In: Carter, JF, eds. Sunflower Science and Technology. Madison, ASA, 55-88.

Kubitzki K. 1998. *Flowering Plants. Monocotyledons: Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Volume IV. In: Kubitzki K. The families and Genera of Vascular Plants. Berlin, Springer.

Loeuille, 2011. Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae). Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Loeuille B, Nakajima JN, Oliveira DMT, Semir J, Pirani JR. 2013. Two New Species of *Heterocoma* (Asteraceae: Vernoniae) and a Broadened Concept of the Genus. *Systematic Botany* **38**: 242-252.

Machado SR, Marcati CR, Morretes BL, Angyalossy V. 2005. Comparative bark anatomy of root and stem in *Styrax camporum* (Styracaceae). *IAWA Journal* **26**: 477-487.

Maddison W, Maddison D. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. <http://mesquiteproject.org>.

Marzinek, J., De-Paula, O.C., Oliveira, D.M.T., 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Revista Brasileira de Botânica* 31, 549–553.

Marzinek, J., Oliveira, D.M.T., 2010. Structure and ontogeny of the pericarp of six Eupatorieae (Asteraceae) with ecological and taxonomic considerations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82, 279–291.

Nicolaus RA, Piatelli M, Fattorusso E. 1964. The structure of melanins and melanogenesis: IV. On some natural melanins. *Tetrahedron* 20: 1163–1172.

Nogueira A, El Ottra JHL, Guimarães E., Machado SR, Lohmann LG. 2013. Trichome structure and evolution in Neotropical lianas. *Annals of Botany* 112: 1331-1350.

Pace MR, Lohmann LG, Angyalossy V. 2011. Evolution of disparity between the regular and variant phloem in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 98: 602–618.

Pace MR, Angyalossy V. 2013. Wood Anatomy and Evolution: A Case Study in the Bignoniaceae. *International Journal of Plant Sciences* 174: 1014-1048.

Pandey AK, Lee WW, Sack FD, Stuessy TF. 1989. Development of the phytomelanin layer in fruits of *Ageratum conyzoides* (Compositae). *American Journal of Botany* 75: 739–746.

Pandey AK. 1998. Development of phytomelanin in fruits of *Tagetes patula* (Asteraceae). *Journal of Indian Botanical Society* 77: 35 – 38.

Pandey AK, Dhakal MR. 2001. Phytomelanin in Compositae. *Current Science* 80: 933 -940.

Pandey AK, Singh RP. 1983. Development and structure of seeds and fruits in Compositae: tribe Eupatorieae. *Journal of the Indian Botanical Society* 62: 276–281.

Pandey AK., Stuessy TF, Mathur RR. 2014. Phytomelanin and Systematics of the Heliantheae Alliance (Compositae). *Plant Diversity and Evolution* 131: 1-21.

Robinson H. 2009. An introduction to micro-characters of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 89-100.

Rogers CE, Stafford RE, Kreitner GL. 1982. *Phytomelanin development and role in hybrid resistance to Homoeosoma electellum (Hulst.) larvae.* In: Proceedings of the 10th International Sunflower Conference, Surfers Paradise, Australia, 138–141.

Sakai WS. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* 48: 247-249.

Semir J, Rezende AR, Monge M, Lopes NP. 2011. As arnicas endêmicas das serras do Brasil: uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae). Ouro Preto, Editora UFOP.

Silva EMS.; Hayashi AH.; Appezzato-da-Glória B. 2014. Anatomy of vegetative organs in *Aldama tenuifolia* and *A. kunthiana* (Asteraceae: Heliantheae). *Brazilian Journal of Botany*, 10.1007/s40415-014-0101-2

Tadesse M, Crawford, DJ. 2014. The phytomelanin layer in traditional members of *Bidens* and *Coreopsis* and phylogeny of the Coreopsideae (Compositae). *Nordic Journal of Botany* 32: 80-91.

Thomson RH. 1976. *Miscellaneous pigments.* In: Goodwin, TW, ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.* London, Academic Press, 597–623.

Upton R, Graff A, Jolliffe G, Laenger R, Williamson E. 2011. *American Herbal Pharmacopoeia. Botanical Pharmacognosy – Microscopic Characterization of Botanical Medicines.* Boca Raton, CRC Press, 363-373, 510-512.

Wittich, P.E., Graven, P., 1995. Histochemical study of the development of the phytomelan layer in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* 187, 72–78.

Wittich, P.E., Graven, P., 1998. Callose deposition and breakdown, followed by phytomelan synthesis in the seed coat of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Protoplasma* 201, 221–230.

DADOS SUPLEMENTARES

Apêndice 1. Espécies de Lychnophorinae com estudo estrutural completo das folhas (lâmina, pecíolo e bainha) e caules (das regiões apicais às lenhosas).

Espécies	Nós avaliados	Coordenadas Geográficas	Identificação
<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob.	1° - 20°	S16°35'37.6'' W42°54'07.7''	Loeuille <i>et al.</i> 533
<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	1° - 15°	S12°54'11.1" W39°12'06.6"	Loeuille <i>et al.</i> 680
<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.	1° - 10°	S18°23'49.9'' W43°21'21.0''	Lusa <i>et al.</i> 63
<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	1° - 30°	S18°11'52.0'' W43°37'33.0''	Loeuille <i>et al.</i> 531
<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir.	1° - 15°	S18°07'42.1'' W43°22'40.5''	Lusa <i>et al.</i> 61
<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	1° - 10°	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	Loeuille <i>et al.</i> 528
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	1° - 50°	S18°11'52.5'' W43°37'33.1''	Loeuille <i>et al.</i> 530
<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.	1° - 50°	S13°31'33.4'' W41°57'55.5''	Loeuille <i>et al.</i> 673
<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.	*	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	Loeuille <i>et al.</i> 529
<i>Paralychnophora bicolor</i> (DC.) MacLeish	1° - 20°	S13°31'33.7" W41°57'56.7"	Loeuille <i>et al.</i> 672
<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille	1° - 30°	S18°23'53,8'' W43°19'33,0''	Lusa <i>et al.</i> 62
<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	*	S19°17'28.1'' W43°36'01.5''	Loeuille <i>et al.</i> 524
<i>Proteopsis argentea</i> Mart. & Zucc. ex DC.	*	S19°06' W43°40'	Loeuille <i>et al.</i> 21

* Espécies caulirosuladas. Todos os entrenós foram analisados.

Apendice 2. Espécies de Lychnophorinae utilizadas e respectivas identificações

Espécies	Identificações
<i>Piptocarpha oblonga</i> (outgroup)	W. Hoehne 3207 SP, São Paulo, Jabaquara 04/08/1949
<i>Pithecoseris pacourinoides</i> (outgroup)	Loeuille 350
<i>Albertinia brasiliensis</i>	Harley 50513
<i>Anteremanthus hatschbachii</i>	Loeuille et al. 533
<i>Blanchetia heterotricha</i>	Loeuille et al. 680
<i>Chronopappus bifrons</i>	Lusa et al. 63
<i>Eremanthus arboreus</i>	Loeuille 510
<i>Eremanthus argenteus</i>	Loeuille 839
<i>Eremanthus auriculatus</i>	Loeuille 836
<i>Eremanthus brevifolius</i>	Loeuille 71
<i>Eremanthus capitatus</i>	Grillo 47
<i>Eremanthus cinctus</i>	Loeuille 306
<i>Eremanthus crotonoides</i>	Loeuille 25
<i>Eremanthus elaeagnus</i>	Simão-Bianchini CFCR 13174
<i>Eremanthus erythropappus</i>	Loeuille 861
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	Loeuille 831
<i>Eremanthus goyazensis</i>	Loeuille 275
<i>Eremanthus incanus</i>	Cordeiro CFCR 10058
<i>Eremanthus leucodendron</i>	Loeuille et al. 669
<i>Eremanthus mattogrossensis</i>	Loeuille 453
<i>Eremanthus mollis</i>	Loeuille 39
<i>Eremanthus pabstii</i>	Loeuille 833
<i>Eremanthus polycephalus</i>	Loeuille et al. 531
<i>Eremanthus uniflorus</i>	Loeuille 840
<i>Eremanthus veadeiroensis</i>	Loeuille 837
<i>Gorceixia decurrens</i>	Loeuille 821
<i>Heterocoma albida</i>	Nakajima 3074, Loeuille 450
<i>Heterocoma gracilis</i> sp. ined.	Lusa et al. 61
<i>Heterocoma robinsoniana</i> sp. ined.	Romero 3265
<i>Hololepis pedunculata</i>	Loeuille 259
<i>Lychnophora bishopii</i>	Harley CFCR 14267
<i>Lychnophora crispa</i>	Harley PCD 4427
<i>Lychnophora diamantinana</i>	Loeuille et al. 530
<i>Lychnophora ericoides</i>	Pirani 1726
<i>Lychnophora gardneri</i>	Loeuille 102
<i>Lychnophora granmogolensis</i>	Loeuille et al. 665
<i>Lychnophora itacambirensis</i> sp. ined.	Mello-Silva 3186

Apêndice 2. Espécies de Lychnophorinae utilizadas e respectivas identificações

Espécies	Identificações
<i>Lychnophora joliana</i> sp. ined.	Loeuille 112
<i>Lychnophora markgravii</i>	Kawasaki CFCR 8078 (ramo floral) Mello Silva 446 (caule)
<i>Lychnophora mellobarretoi</i>	Loeuille 507
<i>Lychnophora mellosilvae</i> sp. ined.	Loeuille 827
<i>Lychnophora passerina</i>	Saavedra 562
<i>Lychnophora pinaster</i>	Mello Silva 1389
<i>Lychnophora ramosissima</i>	Loeuille 448
<i>Lychnophora regis</i>	Hind PCD 3537
<i>Lychnophora salicifolia</i>	Mello Silva 3000
<i>Lychnophora santosii</i>	Loeuille et al. 668
<i>Lychnophora sellowii</i>	Loeuille 79
<i>Lychnophora syncephala</i>	Souza 5553
<i>Lychnophora tomentosa</i>	Loeuille et al. 528
<i>Lychnophora triflora</i>	Loeuille et al. 658
<i>Lychnophora villosissima</i>	Loeuille 81
<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	Loeuille 435
<i>Lychnophoriopsis damazioi</i>	Arbo 4154
<i>Lychnophoriopsis hatschbachii</i>	Semir CFCR 9552
<i>Minasia alpestris</i>	Menezes CFCR 103
<i>Minasia cabralensis</i>	Loeuille 433
<i>Minasia cipoensis</i> sp. ined.	Loeuille 494
<i>Minasia scapigera</i>	Loeuille et al. 529
<i>Minasia ramosa</i> sp. ined.	Mello Silva 3223
<i>Paralychnophora atkinsiae</i>	Roque 1446
<i>Paralychnophora glaziouana</i> sp. ined.	Loeuille 451
<i>Paralychnophora harleyi</i>	Conceição 34
<i>Paralychnophora patriciana</i>	Loeuille 329
<i>Paralychnophora reflexoauriculata</i>	Loeuille 396
<i>Paralychnophora bicolor</i>	Loeuille et al. 672
<i>Piptolepis ericoides</i>	Mello Silva 1377
<i>Piptolepis oleaster</i>	Loeuille 517
<i>Piptolepis monticola</i>	Lusa et al. 62
<i>Piptolepis riparia</i> sp. ined.	Loeuille 516
<i>Piptolepis schultziiana</i>	Loeuille 20
<i>Prestelia eriopus</i>	Loeuille et al. 524
<i>Proteopsis argentea</i>	Loeuille et al. 21
<i>Proteopsis hermogenesi</i>	Mello Silva 3008

Apêndice 2. Espécies de Lychnophorinae utilizadas e respectivas identificações

Espécies	Identificações
<i>Sipolisia lanuginosa</i>	Loeuille 635
<i>Xerxes ekmaniana</i>	Loeuille 838
<i>Lychnophora brunioides</i>	Loeuille 466

Apêndice 3. Ocorrência de fitomelanina nas espécies avaliadas

Espécies	Caulo jovem				Caulo espessado				Folha		
	Cor	Flo	Xil	Med	Cor	Flo	Xil	Med	Bain	Pec	Lam
<i>Piptocarpha oblonga</i> (outgroup)	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0
<i>Chresta pacourinoides</i> (outgroup)	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
<i>Albertinia brasiliensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	-	0	0
<i>Anteremanthus hatschbachii</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>Blanchetia heterotricha</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	-	0	0
<i>Chronopappus bifrons</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>Eremanthus arboreus</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus argenteus</i>	-	-	-	-	1	1	0	1	-	1	0
<i>Eremanthus auriculatus</i>	0	0	0	1	0	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus brevifolius</i> sp. ined.	0	0	0	1	1	1	0	1	-	-	0
<i>Eremanthus capitatus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	-	0	0
<i>Eremanthus cinctus</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus elaeagnoides</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Eremanthus elaeagnus</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	-	1	0
<i>Eremanthus erythropappus</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	-	1	0
<i>Eremanthus goyazensis</i>	0	0	0	0	-	1	1	1	-	0	0
<i>Eremanthus incanus</i>	0	0	0	1	0	1	0	1	-	1	0
<i>Eremanthus leucodendron</i>	1	0	0	1	-	1	0	1	-	1	0
<i>Eremanthus mattogrossensis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus mollis</i>	0	0	0	1	1	0	0	1	-	-	0
<i>Eremanthus pabstii</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	-	-	0
<i>Eremanthus polycephalus</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	-	0	0
<i>Eremanthus uniflorus</i>	0	0	0	0	-	1	1	0	-	0	0
<i>Eremanthus veadeiroensis</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	-	0	0
<i>Gorceixia decurrens</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	-	1	1
<i>Heterocoma albida</i>	1	1	0	1	1	1	0	1	0	-	0
<i>Heterocoma gracilis</i> sp. ined.	0	0	0	0	1	1	0	1	0	-	0
<i>Hololepis pedunculata</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Lychnophora bishopii</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	-	0	0
<i>Lychnophora crispa</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	-	1	0
<i>Lychnophora diamantinana</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	-	1	0
<i>Lychnophora ericoides</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	-	1	1
<i>Lychnophora gardneri</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	-	1	1
<i>Lychnophora granmogolensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	-	-	0
<i>Lychnophora itacambirensis</i> sp. ined.	1	0	0	1	-	-	-	-	-	0	0
<i>Lychnophora joliana</i> sp. ined.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	-	0
<i>Lychnophora markgravii</i>	0	0	0	0	1	1	0	1	1	-	0
<i>Lychnophora mellobarretoii</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0

CAPÍTULO 3

**Trichomes related to an unusual way for water retention and protection of
the stem apex in *Lychnophora diamantinana* (Asteraceae)**

(Artigo submetido para publicação)

An unusual way for water retention on stem apex in

***Lychnophora diamantinana* (Asteraceae)**

Makeli Garibotti Lusa^{1,2}, Elaine Cristina Cardoso¹, Silvia Rodrigues Machado³, Beatriz

Appezato-Da-Glória¹

¹ *Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz',*

Universidade de São Paulo, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil

² *Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P.*

6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

³ *Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP,*

18618-000 - Botucatu, SP - Brasil

ABSTRACT

-Background and Aims *Lychnophora diamantinana* is a species endemic to the Brazilian *campos rupestres* (rocky fields), a region characterised by intense solar radiation and water deficits. It is thought that the function of trichomes (glandular and non-glandular) is to protect plant organs, but studies on their structure and function are necessary to understand their adaptive significance in plants that are exposed to intense solar radiation and drought. This study sought to investigate trichomes and the origin of the substances observed on the stem apices of *L. diamantinana*.

-Methods Samples of stem apices and young leaves were studied using standard techniques, including light microscopy and scanning and transmission electron microscopy. Histochemical tests were used to identify the major groups of metabolites present in the trichomes and the hyaline material deposited on the apices.

-Key Results Non-glandular trichomes and glandular trichomes were observed. The material deposited on the stem apices was 'hyaline, highly hydrophilic and viscous. This secretion primarily consists of carbohydrates that results from the partial degradation of the cell wall of the uniseriate trichomes and it also contains the terpenoids and phenolic compounds secreted by the glandular trichomes.

-Conclusion These results suggest that the non-glandular trichomes on the leaves of *L. diamantinana* help protect the young organ, particularly against desiccation, by deposition of highly hydrated substances on the apices. After partial degradation of the terminal cell wall, the non-glandular trichomes become fibrous and seem to play a role in protecting the expanded leaf.

Key words: cell wall degradation, non-glandular trichomes, glandular trichomes, histochemistry, stem apex humidification, *Lychnophora diamantinana* N.C. Coile & S.B. Jones, Asteraceae.

INTRODUCTION

Traditionally, it has been thought that trichomes protect plant organs, and several studies have investigated their role in the adaptation of plants to harsh environments (Fahn, 1979; Werker, 2000; Paiva and Martins, 2011). Recent studies (Paiva, 2009; Paiva and Martins, 2011; Mercadante-Simões and Paiva, 2013; Mayer *et al.*, 2013) have shown that the production of hydrophilic substances by glandular trichomes and the deposition of this secretion on young organs may facilitate water retention, thus preventing desiccation and favouring organ growth until the plant develops other protective mechanisms. However, more studies on the structure and function of non-glandular trichomes, or covering, trichomes are necessary to understand their adaptive significance in plants that are exposed to intense solar radiation and drought.

The subtribe Lychnophorinae comprises species with a wide variety of non-glandular trichomes, including an elongated non-branched type and several branched types, such as spurred, two-armed, three-to-five-armed and stellate (Wagner *et al.*, 2014). The general protection function of these trichomes, which is important in the *campos rupestres* (rocky fields) environments inhabited by most of the species, has been debated (Semir *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2014).

The *campos rupestres* are vegetation formations in the Cerrado domain and are characterised by rocky formations with altitudes that are usually greater than 900 meters; the soils are shallow, with rapid drainage, acidic and nutrient-poor, with low organic matter content, and originate from the decomposition of quartzite and arenite (Ribeiro and Walter

2008). These environments experience a dry season and a rainy season, and constant winds, intense solar radiation, daily temperature fluctuations and fires (during the dry season) are common (Goodland and Ferri, 1979; Ratter *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2009). In this environment, the growth and development of new plant organs usually begins in the spring, before the rainy season (Ribeiro and Walter, 2008), and thus, the plant will likely face extreme weather conditions that require the use of mechanisms to protect these organs. The *Lychnophora diamantinana* N.C. Coile & S.B. Jones is endemic to the *campos rupestres* and is found on rocky outcrops or slopes (Coile and Jones, 1981).

In this study, we describe for the first time an unusual way for water retention on the stem apices of *L. diamantinana*: the partial degradation of the cell wall of the terminal cells in the non-glandular trichomes provides hygroscopic polysaccharides for this water retention. We also identify the origin and structure of the trichomes as well as the chemical content of the deposited substances, which we consider from a functional perspective.

MATERIALS AND METHODS

L. diamantinana is distributed along the Espinhaço Range in the State of Minas Gerais and is found at altitudes between 1300 and 1500 meters (Coile and Jones, 1981). The analysed material was collected in the Biribiri State Park, which is in the Municipality of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. Voucher specimens were deposited in the SPF Herbarium (University of Sao Paulo) under voucher Loeuille *et al.* 530. Samples from the stem apices with young or completely expanded leaves were collected from three individuals.

For light microscopy analyses, samples were fixed in Karnovsky's solution (Karnovsky, 1965, modified using pH 7.2 phosphate buffer), placed in a vacuum chamber to remove the air in the tissues, dehydrated in an ethanol series and embedded in hydroxyethyl methacrylate Leica Histo-resin® (Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany), following the manufacturer's instructions, and sectioned at 5-7 µm thickness on a rotary microtome (Model RM 2245, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany). For structural analysis, the sections were stained with toluidine blue 0.05% in citrate-phosphate buffer, pH 4.5 (Sakai 1973), and mounted in synthetic resin Entellan® (Merck®, Darmstadt, Germany).

Histochemical reactions were performed using fresh material and/or embedded material, as described above. The staining reactions included PAS (periodic acid-Schiff) for total polysaccharides (McManus, 1948); Calcofluor White M2R (Hughes and McCully, 1975) for cellulose measurements using fluorescence; Coriphosphine (Ueda and Yoshioka, 1976) for pectin measurements using fluorescence; Sudan IV (Jensen, 1962) for lipophilic substances; NADI reagent (David and Carde, 1964) for the terpenoids; ferric chloride (Johansen, 1940) for general phenolic compounds; and Aniline Blue Black (Fisher, 1968) and Xylidine Ponceau (Vidal, 1970) for proteins. The sections were examined immediately after each reaction. For the Calcofluor White test, the sections were observed under a epifluorescence microscope (Model DM LB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with an "HBO 100 W mercury vapour lamp" and a violet excitation filter (bandpass filter; 355-425 nm). For the Coriphosphine test, the induced fluorescence was observed using the same microscope with a blue excitation filter (bandpass filter; 420-490 nm). Control sections were examined simultaneously with the histochemical tests, using

standard procedures. To determine the natural characteristics of the organs and secretions, untreated sections were mounted and observed. Light microscopy results were recorded using a video camera (DC 300F Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, Switzerland) coupled to the Leica® DM LB microscope to obtain images of the sections.

For scanning electron microscopy (SEM) analyses, samples were fixed in Karnovsky (Karnovsky 1965) solution for 24 h, dehydrated in a graded ethanol series and critical-point dried with CO₂. The samples were attached to aluminium stubs and coated with gold (30–40 nm). Finally, the samples were examined under a LEO VP435 (Zeiss, Oberkochen, Germany) scanning electron microscope at 20 kV.

Transmission electron microscopy (TEM) was used for ultrastructure analysis. Samples of leaf primordia were collected and fixed in glutaraldehyde (2.5% in 0.1 M, pH 7.3, sodium phosphate buffer) for 24 hours, post-fixed with osmium tetroxide (1.0% in 0.1 M, pH 7.3, sodium phosphate buffer) for two hours and incubated in uranyl acetate (0.5% in aqueous solution). The samples were dehydrated through a graded series of acetone and the material was embedded in Araldite resin. Ultrathin sections were contrasted using uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) and examined under a Philips Model EM 100 transmission electron microscope operating at 80 kV.

RESULTS

Lychnophora diamantinana is a treelet that has stems with very short internodes and overlapping leaves, spirally arranged (Fig. 1A-B). The leaf primordia and young leaves at the stem apices are covered by a viscous and hyaline substance (Fig. 1C-D), which is

macroscopically visible in the field, especially after rain or fog. Young leaves are completely covered with the substance (Fig. 1C-D) that is spread over and between the trichome mesh (Fig. 1E). Fully expanded leaves may retain some of the material, giving the leaf surface a whitish appearance when dry (Fig. 1B).

Leaf primordia and young leaves have two types of trichomes (Fig. 2A-B): glandular trichomes, which have a pair of cells forming the peduncle and four to five pairs of secretory cells (Fig. 2C), and non-glandular trichomes, which are formed by three to seven cells and have an expanded terminal cell that can be simple or branched (Fig. 2B and 2D). The glandular trichomes are found on the abaxial side of the organ, whereas the non-glandular trichomes occur on both surfaces of the organ (Fig. 2A); the latter form a dense network covering the glandular trichomes, particularly the abaxial surface (Fig. 2E). The adaxial surface of fully expanded leaves becomes glabrous, while the abaxial side remains pilose (Fig. 2F).

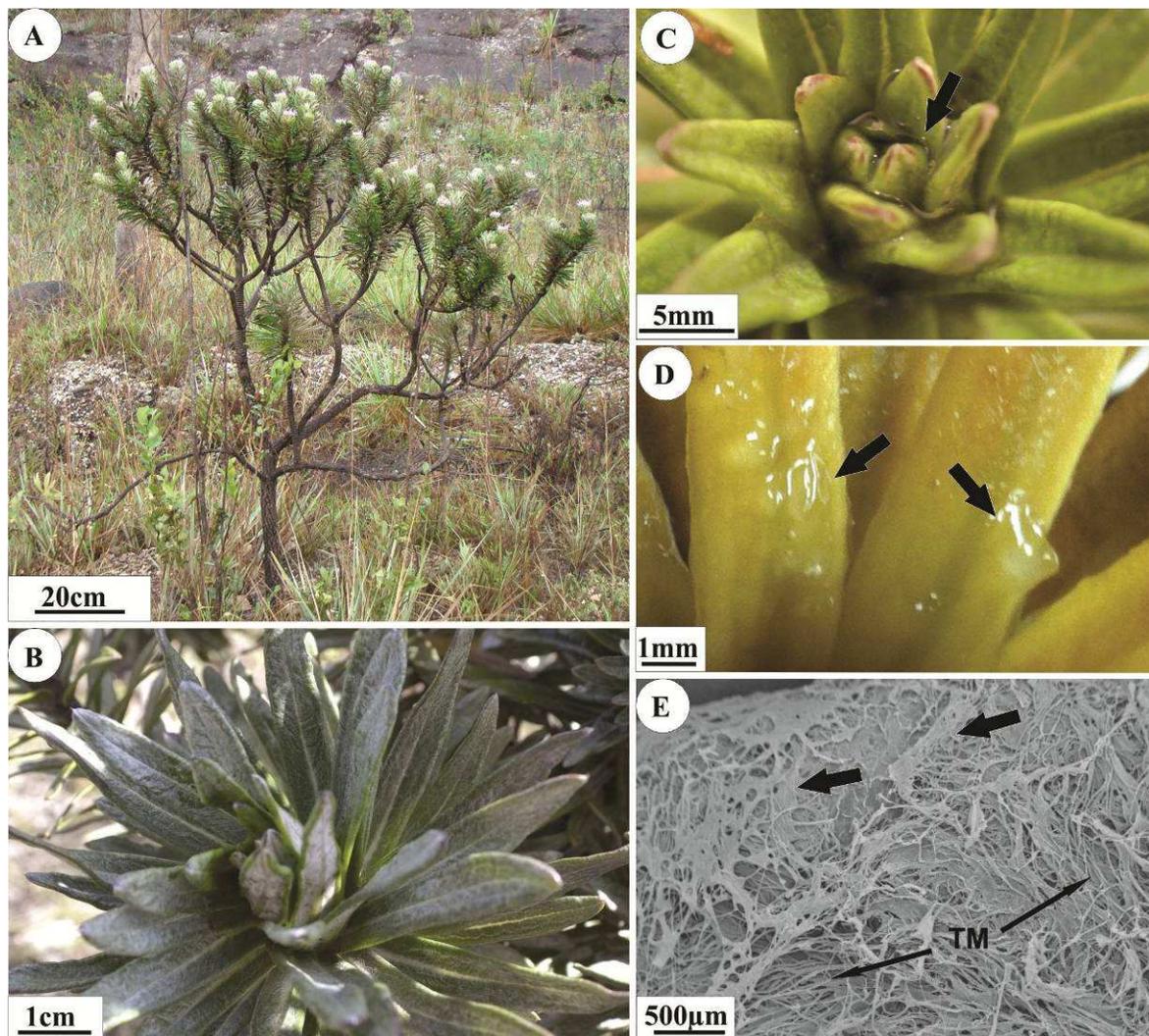


Figure 1. Morphological characteristics of *Lychnophora diamantinana*. A. Treelet habit, exhibiting branches with overlapping leaves. B. Stem apex with pronounced leaf overlap and whitish appearance. C and D. Detail of the apical region of the branch with hyaline substance (arrows) on the young leaves. E. Scanning electron micrograph showing this substance (arrow) spread over and between the trichome mesh (TM) on the young leaf.

Trichomes differentiate very early, in 0.5-mm-long leaf primordia (Fig. 2G-H). The non-glandular trichomes arise from a protodermal cell with a dense cytoplasm and a conspicuous nucleus (Fig. 2H-I); this cell elongates anticlinally and divides periclinally to form two cells (Fig. 2J). The cell facing the organ becomes the basal cell of the trichome,

while the cell facing the exterior divides periclinally to generate between two and six cells (Fig. 2K) and the distal cell expands directly after the last division (Fig. 2L). One or more cells will form the peduncle (Fig. 2L and 2D). Next, the terminal cell nucleus elongates (Fig. 2M and 2D) and breaks down, while the other trichome cells remain active and have intact nuclei (Fig. 2N).

In leaf primordia that are approximately 2.5 mm, modifications occur in the cell wall of the terminal cell of the non-glandular trichomes of the young leaves; these modifications include loosening of the cell wall structure together with retraction of the protoplast which becomes denser (Fig. 2O-R).

The terminal cell of the non-glandular trichome exhibits a well-developed vacuole and a low density cytoplasm (Fig. 3A) with dispersed lipid droplets (Fig. 3B-C). Parietal degradation begins with the loosening of cellulose microfibrils (Fig. 3C). The inner portion becomes compact (Fig. 3D-F) and occurs the expansion of the pectin matrix in the most outer cell wall areas (Fig. 3D-E). In the cells where the outer part of the wall has degraded, the protoplast is very electron-dense and fragmented, with no visible organelles (Fig. 3D and F), and the cuticle loses its cohesive appearance (Fig. 3G).

Histochemical analysis showed that the cell wall of the terminal cell of non-glandular trichomes mainly consists of polysaccharides (Fig. 4A-C). After degradation of outer portion of the cell wall (Fig. 4B-C) is observed that the inner portion of the cell wall is compact and presents cellulosic nature (Fig. 4D), while in the most outer portion (Fig. 4E) and in the products of the cell wall degradation most of the carbohydrates are pectins.

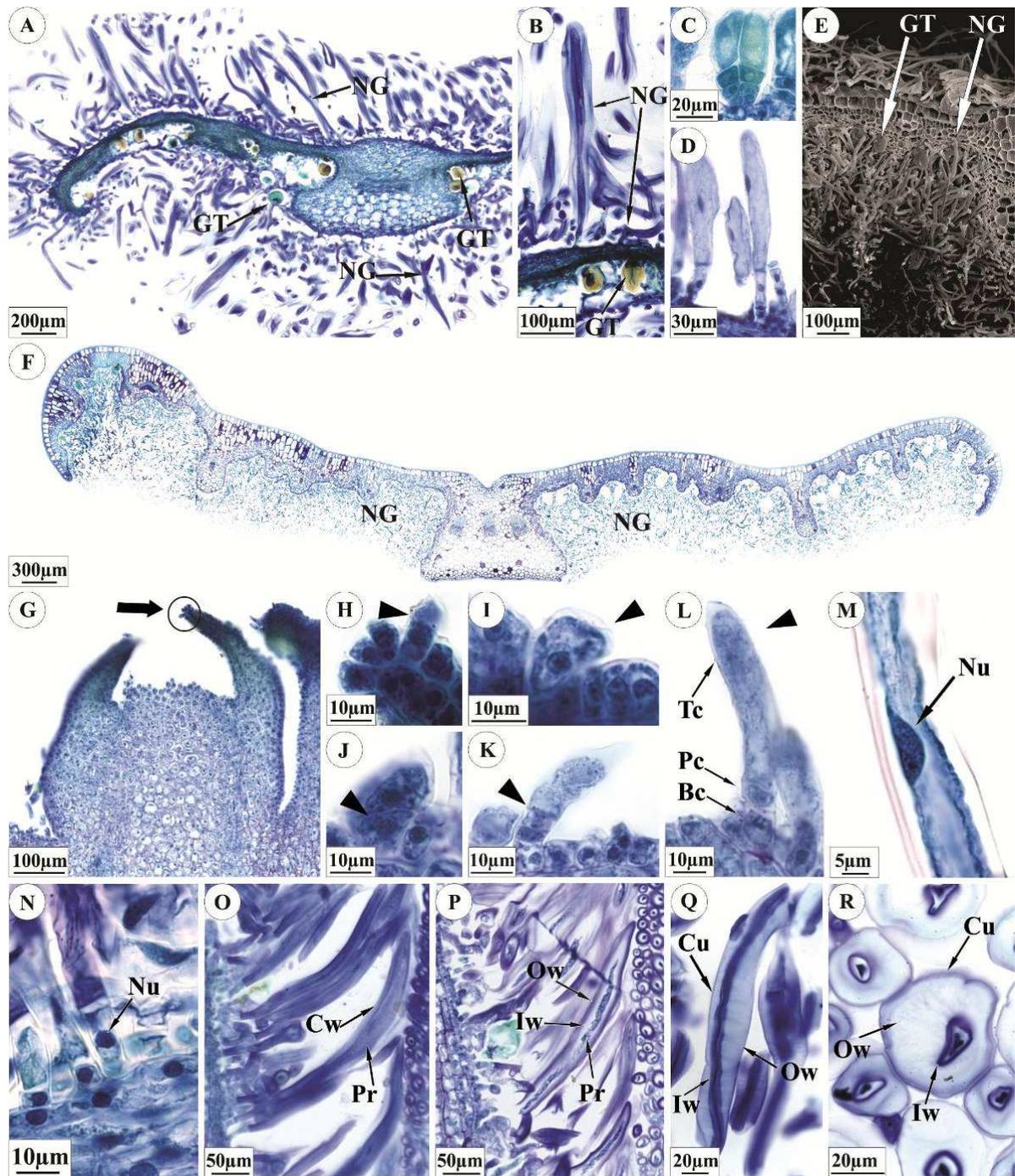


Figure 2. Characterisation and development of trichomes in *Lychnophora diamantinana*. A. Cross-section of the leaf primordium displaying non-glandular trichomes (NG) on both surfaces, and glandular trichomes (GT) on the abaxial surface. B. Inset showing an NG with its expanded terminal cell and CT. C. Glandular trichome. D. Early stage of development of NG. E. Scanning electron micrograph of a cross-section of the young leaf with CTs on the abaxial surface and fibrous NGs. F. Cross-section of a fully expanded leaf, which is glabrous

on the adaxial surface and pilose on the abaxial surface. G. Stem apical bud with a leaf primordium that exhibits a trichome under differentiation (circle). H. Inset of the beginning of NG differentiation. I-L. NG development (arrowhead). In L, note the trichome structure: basal cell (Bc), peduncle cell (Pc) and terminal cell (Tc). M-P. NG with changes in the nucleus (Nu), cell wall (Cw) and protoplast (Pr) of the terminal cell. Q-R. Terminal cell of the non-glandular trichome sectioned longitudinally (Q) and transversally (R); the images show extended cuticle (Cu), the outer cell wall (Ow) with a loose structure and an compact inner cell wall (Iw).

The inner portion of the cell wall remains compact (Fig. 4F), while the outer portion is replaced by products that resulted from its degradation (Fig. 4F). Sudan IV testing confirmed that the droplets observed in the protoplast are lipophilic and indicated the presence of cuticle in the terminal cells (Fig. 4G) prior to the release of the cell wall degradation product. Cuticle rupture leads to the release of the product and leaves the undegraded cellulosic portion exposed (Fig. 4H). After the outer cell wall degradation, the terminal cell of the trichome lacks protoplasm. In contrast, the basal cell retains an intact protoplasm, as does the cell(s) of the peduncle (Fig.4I), which has suberised walls. The suberisation is continuous with the cuticle of the common epidermal cells (Fig. 4J).

In addition, histochemical analysis indicated that the glandular trichomes also participate in the production of the hyaline substance found in the stem apices via the production of hydrophilic and lipophilic substances (Fig. 4K-L). These substances include the terpenoids (Fig. 4M), phenolic compounds (Fig. 4N) and proteins (Fig. 4O). Despite this production, the secretion of hydrophilic substances by the glandular trichomes is substantially less than the amount of these substances produced by the partial degradation of the wall of the non-glandular trichomes (Fig. 4P).

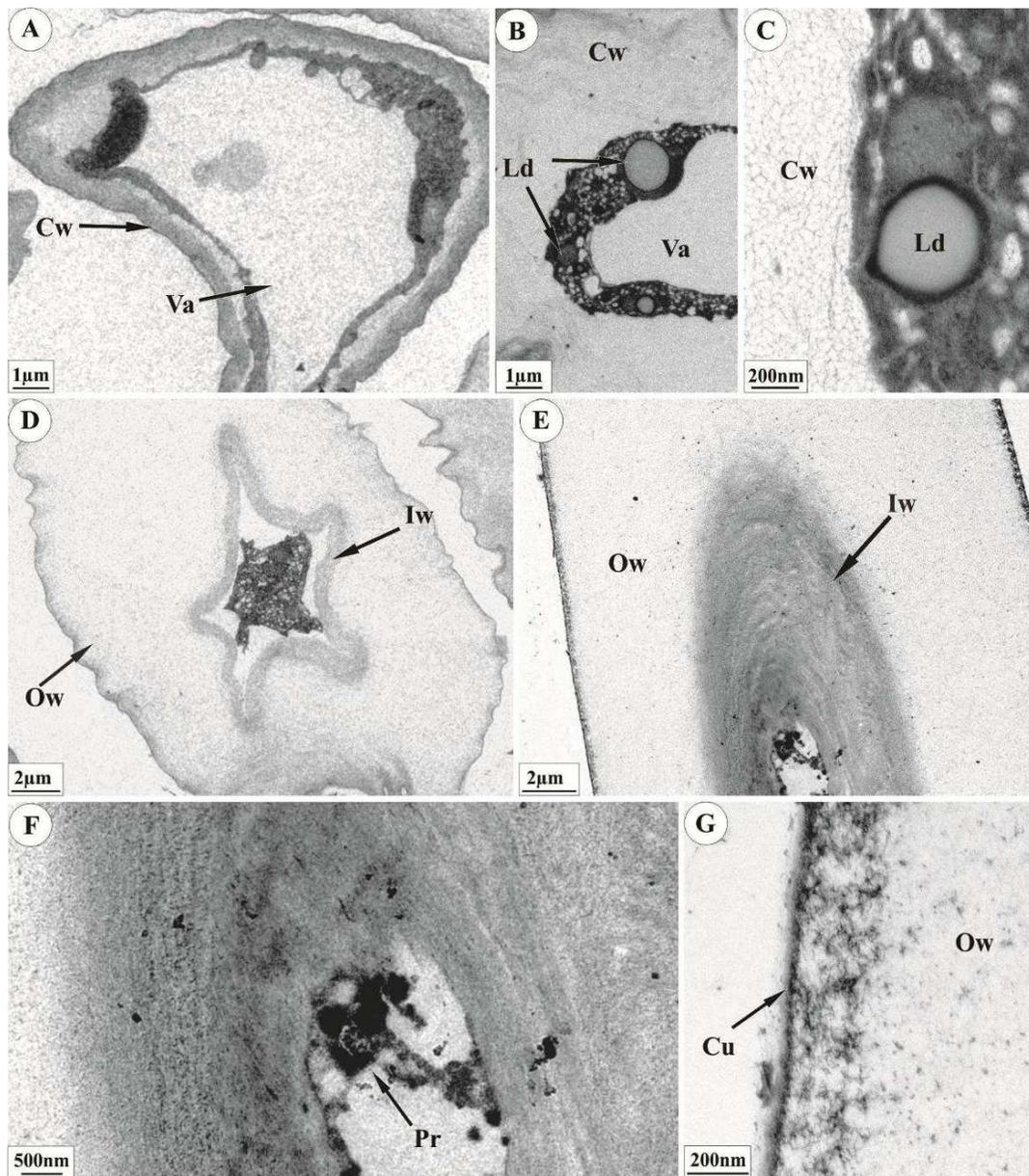


Figure 3. Non-glandular trichomes in *Lychnophora diamantinana*. Transmission electron micrograph of the terminal cell of the trichome. A. Terminal cell showing a large vacuole (Va) and a slightly cohesive cell wall (Cw). B and C. Terminal cell exhibiting a cell wall with a very loose structure and a protoplast with lipid droplets (Ld). The fibrillar structure of cell wall is noted in C. D. Overview of a terminal cell with an compact inner portion of the cell wall (Iw) and a loosened outer portion (Ow). E and F. Inner portion of the cell wall with a compact structure and modified protoplast (Pr). G. Detail of the alteration in the cuticle and of the outer portion of the cell wall.

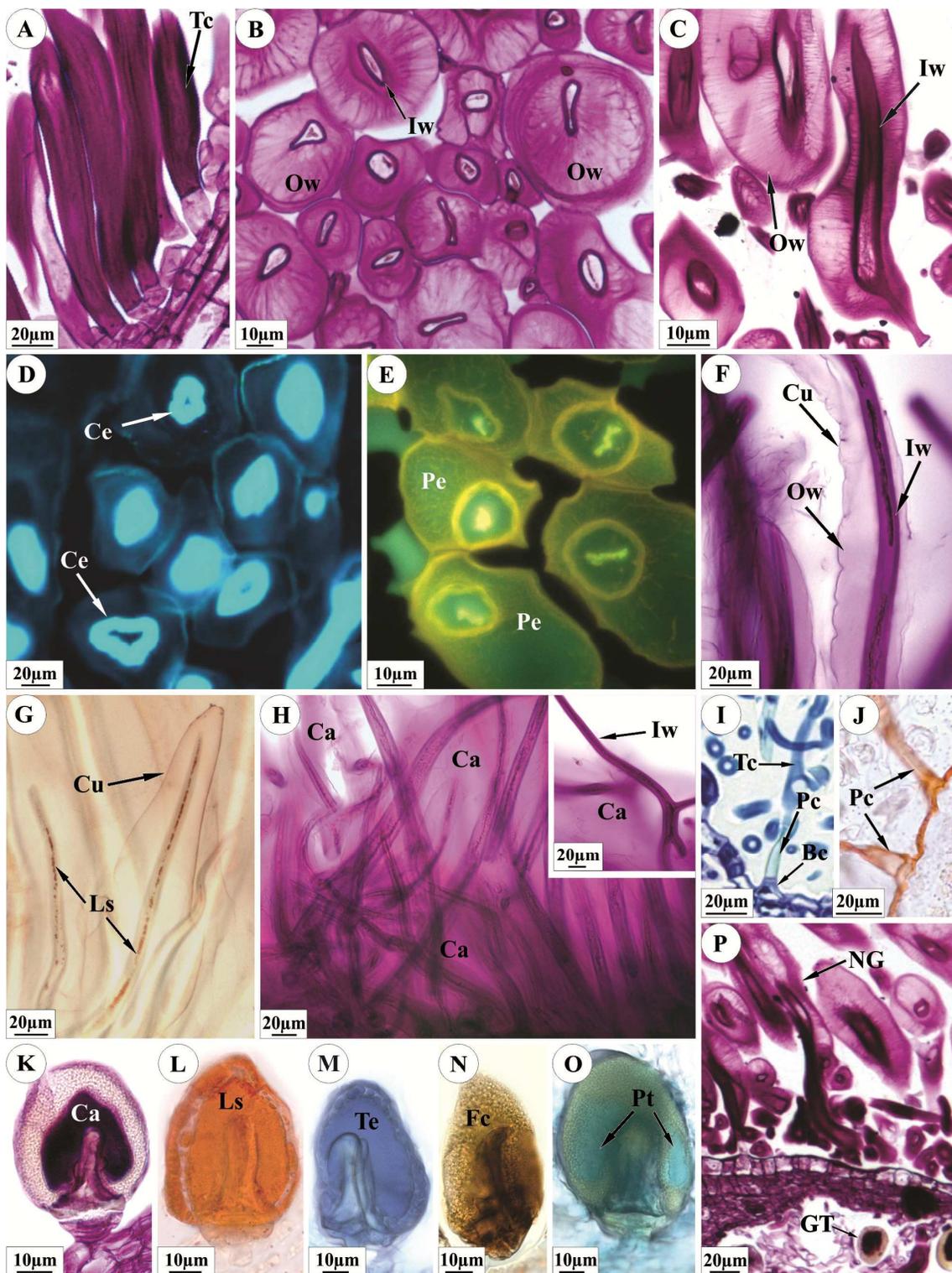


Figure 4. Non-glandular trichomes (NG) (A-J and P) and glandular trichomes (GT) (K-P) in *Lychnophora diamantinana*. A-C. Terminal cells (Tc) displaying carbohydrates in

the cell wall. In A, trichomes before the degradation of outer cell wall. Note in B-C the compact inner portions of the cell wall (Iw) and the outer portion (Ow) with a loose structure. D. Cellulose (Ce) in the inner portion of the terminal cell. E. Pectin (Pe) in the altered cell wall. F-G . Terminal cell before rupture of the cuticle (Cu). The lipophilic substances (Ls) in the protoplast are shown in G. H. Non-glandular trichomes with carbohydrates (Ca) spread over and between the trichomes; inset illustrates a branched terminal cell after rupture of the cuticle. I. Non-glandular trichome in a fully expanded leaf exhibiting the basal cell (Bc), peduncle cell (Pc) and terminal cell (Tc). J. Detail of peduncle cells showing the thickening of the suberin that is continuous with the cuticle. K-O. Glandular trichomes with positive histochemical staining for exudate in the subcuticular space. P. Young leaf with a large amount of carbohydrates in non-glandular trichomes and comparatively less material in glandular trichomes. Histochemical staining: carbohydrates (Ca) by the Schiff reaction (A-C, F, H, K, P); cellulose (Ce) by Calcofluor White (D); pectins (Pe) by Coriphosphine (E); lipophilic substances (Ls) by Sudan IV (G, J, L); terpenoids (Te) by the NADI reaction (M); phenolic compounds (Fc) by ferric chloride (N); and proteins (Pt) with Aniline Blue Black (O).

DISCUSSION

Cell-wall degradation occurs in a wide variety of situations: as part of normal processes in the plant lifecycle, such as seed germination, xylem vessel formation and the growth, maturation and abscission of fruit; as part of processes where other organisms, such as fungi and herbivores, break down plant material; or even as important tools in industrial processes (Brett and Waldron, 1990). However, this study reports for the first time a process of partial cell wall degradation of the trichome terminal cells in leaf primordia and young leaves, protecting stem apices against dehydration. The non-glandular trichomes in *L. diamantinana* resemble typical non-glandular covering trichomes, because they do not present cells with a dense cytoplasm, which is characteristic of secretory cells (Werker, 2000). In these trichomes, the cell wall partially degrades in the leaf primordia, after the elongation of the terminal cells is complete, and simultaneously with changes in the

protoplast that lead to cell death. A similar cell wall degradation and programmed cell death process was described by Gunawardena *et al.* (2007) for the leaf development in *Aponogeton madagascariensis* (Aponogetonaceae), where the degradation of the cell wall forms perforations during leaf expansion. The authors observed that the components of the cell matrix are degraded, thus exposing a loose fibrillar network, that is sufficiently weakened to allow mechanical rupture. In the non-glandular trichomes of *L. diamantinana*, the cell wall degradation products will be released after the cuticle rupture and then deposited on the surface of the developing leaves in the stem apices.

Our study found that the hyaline substance deposited on the stem apices largely consists of pectic cell wall carbohydrates. The viscosity and gelation properties of a pectin-containing solution are directly related to its chemical composition and structure because the pectin gels form a three-dimensional crystalline network where the water molecules and their co-solutes are captured and show maximum coalescence (Lögfren and Hermansson, 2007; Paiva *et al.*, 2009). The secretion of hydrophilic compounds in plants is associated with the presence of colleters, i.e., trichomes or protrusions that secrete a sticky substance containing a mixture of mucilage or lipophilic substances that cover apical buds to prevent the desiccation (Fahn, 1979). We propose that the hyaline substance observed in *L. diamantinana* has a function analogous to that of colleter secretions based on the following: the similar, predominantly hydrophilic composition; the early differentiation of the non-glandular trichomes, which has also been observed in colleters (Appezato-da-Glória and Estelita, 2000; Paiva and Machado, 2006; Machado *et al.*, 2013; Mayer *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2013); and the brief functional time of these structures, which coincides with the initial

developmental phases of the leaf or other apical organs when protection against desiccation is essential because these organs are highly susceptible to dehydration (Apezato-da-Glória and Estelita, 2000; Paiva and Machado, 2006; Paiva, 2009; Mayer *et al.*, 2013).

According to Paiva (2009), the presence of hydrophilic material, which is produced by colleters, on the young leaves helps to reduce the amount of water that is lost to the external environment and helps to maintain adequate moisture levels in the developing leaf. These actions continue until the leaves develop other types of protection against desiccation, such as a thick cuticle. Hygroscopic polysaccharides that are arranged over the cuticle can improve water retention and promote water vapour absorption through the cuticle (Chamel *et al.*, 1991). These functions are particularly important for development of the stem apical structures in *L. diamantinana*, which inhabits the *campos rupestres*. This environment is characterised by intense solar radiation, water scarcity and fires, especially during the dry season (Ribeiro and Walter, 2008); these conditions require increased protection against dehydration. Fog can be found where this species is located, particularly on winter mornings. Thus, the presence of hygroscopic polysaccharides on the stem apices increases the moisture retention in foggy conditions.

Several species that inhabit *campos rupestres* are known by presence of colleters that provide hydrophilic material, such as species of Apocynaceae (Sales *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2009; Morokawa *et al.*, 2013) and Leguminosae (Coutinho *et al.*, 2013). Additionally, colleters are related in different families from all over the Cerrado Domain characterized by fires, nutrient-poor soils, high temperatures, and usually with a low water supply (Ratter *et al.*, 1997; Ribeiro and Walter, 2008; Simon *et al.*, 2009). In this Domain colleters have been reported in other species of Apocynaceae (Apezato-da-Glória and Estelita, 2000) and in

Celastraceae (Mercadante-Simões and Paiva, 2013), Leguminosae (Fabaceae) (Paiva and Machado, 2006; Paiva, 2009), and Rubiaceae (Barreiro and Machado, 2007). In all these cases the occurrence of hygroscopic polysaccharides on young organs probably plays an important protective function.

As reported in this study, young leaves of stem apices of *L. diamantinana* have glandular trichomes containing phenolic compounds, lipophilic substances (including terpenoids) and proteins. It is well known that glandular trichomes are isolated biosynthetically and structurally and for this reason it is probable that they produce large amount of phytotoxic substances that internal leaf tissues could not synthesize (Werker, 2000). Thus, the glandular trichomes usually contain the most active constituents and these metabolites are considered the first line of defense for the plant, with effective compounds against pathogens and herbivores (Thomson & Healey, 1984; Werker, 2000; Paiva and Machado, 2006; and Miguel *et al.*, 2006). In this study, we suggest that besides the non-glandular trichomes supplying mostly carbohydrates and promoting the water retention on apices, the glandular trichomes contribute in the composition of hyaline substance, mainly with terpenoids, phenolic compounds and proteins, that probably repel herbivore and pathogen attacks. This complex composition was previously registered also in secretions of colleters and it was related to a protection against this type of attacks (Paiva and Machado, 2006 and Miguel *et al.* 2006).

In addition, the function of the non-glandular trichomes in the stem apices of *L. diamantinana* does not appear to be restricted to protection against desiccation. The fibrous structure of the non-glandular trichomes after the rupture of the apical cell cuticle is similar

to the structure reported in *Helichrysum aureonitens* and *Pteronia incana* by Afolayan and Meyer (1995) and Mayekiso *et al.* (2008), respectively. The authors described the occurrence of non-glandular trichomes in Asteraceae species whose apical cell, which is usually elongated, collapses and dies while the basal cells remain alive, giving the trichome a fibrous appearance. According to Afolayan and Meyer (1995), the nature of these trichomes and their distribution on the leaf would suggest a protective role against herbivores and fungal spores that are spread by wind. The suberin deposition on the cell wall of the peduncle cells in *L. diamantinana* is similar to that found for the trichomes of *Pteronia incana* (Asteraceae) leaves by Mayekiso *et al.* (2008) and for xeromorphic leaves by Fahn (1986). This suberisation may function as an apoplastic barrier, such as in the endoderm, preventing water flow into the trichome (Fahn, 1986; Mayekiso *et al.*, 2008).

Trichomes with extremely elongated cells may also protect shorter glandular trichomes (Werker, 2000). We believe that non-glandular trichomes observed in expanded leaves of *L. diamantinana* probably protect the glandular trichomes, by their disposition, forming fibre meshes over these glands.

Thus, the data in this study, especially the data on the composition and brief deposition time of hygroscopic material on the apical stem organs, allow us to infer that the non-glandular trichomes of leaf primordia in *L. diamantinana* function similarly to colleters by helping to protect the developing organs against dehydration. In addition, the structure of the non-glandular trichome, with its fibrous appearance in the expanded leaf, may be important for protecting the organ.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the IEF, MG, Brazil, for granting permission and facilities to collect plant material for this study. This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) - grants [Proc.nº 302776/2010-9, 302657/2011-8] and, the São Paulo Council for Research (FAPESP) - financial support [Thematic Project Proc. no. 2010/51454-3] and grants for the first author [Proc. no. 2010/02085-5].

LITERATURE CITED

Afolayan AJ, Meyer JJM. 1995. Morphology and ultrastructure of secreting and nonsecreting foliar trichomes of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *International Journal of Plant Sciences* **156**: 481-487.

Appezato-da-Glória B, Estelita MEM. 2000. Development, structure and distribution of colleters in *Mandevilla illustris* and *M. velutina* (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **23**: 113-120.

Barreiro DP, Machado SR. 2007. Coléteres dendróides em *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum., uma espécie não-nodulada de Rubiaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 387-399.

Brett C, Waldron K. 1990. Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls. *Topics in Plant Physiology* **2**: 168-179.

Chamel A, Pineri M, Escoubes M. 1991. Quantitative determination of water sorption by plant cuticles. *Plant Cell & Environment* **14**: 87-95.

Coile NC, Jones Jr. SB. 1981. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus Endemic to the Brazilian Planalto. *Brittonia* **33**: 528-542.

Coutinho IAC, Francino DMT, Meira RMSA. 2013. Leaf anatomical studies of *Chamaecrista* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae, Caesalpinioideae): new evidence for the up-ranking of the varieties to the species level. *Plant Systematic and Evolution* **299**: 1709–1720.

David R, Carde J. 1964. Histochemie - coloration differentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du pin maritime au moyen du reactif NADI: *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences* **258**: 1338-1340.

Fahn A. 1979. *Secretory tissues in plants*. London, Academic Press.

Fahn A. 1986. Structural and Functional Properties of Trichomes of Xeromorphic Leaves. *Annals of Botany* **57**: 631-637.

Fisher DB. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* **16**: 92-96.

Goodland R, Ferri MG. 1979. *Ecologia do Cerrado*. Itatiaia, EDUSP.

Gunawardena AHLAN, Greenwood JS, Dengler NG. 2007. Cell wall degradation and modification during programmed cell death in lace plant, *Aponogeton madagascariensis* (Aponogetonaceae). *American Journal of Botany* **94**: 1116-1128.

Hughes J, McCully ME. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology* **50**: 319-329.

Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. San Francisco, W. H. Freeman.

Johansen D. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc.

Karnovsky MJ. 1965. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of cell Biology* **27**: 137a-138a.

Löfgren C, Hermansson AM. 2007. Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocolloids* **21**: 480–486.

Machado AFP, Souza AM, Leitão CAE. 2013. Secretory structures at syconia and flowers of *Ficus enormis* (Moraceae): A specialization at ostiolar bracts and the first report of inflorescence colleters. *Flora* **208**: 45– 51.

Mayekiso, B., Magwa, M. L., Coopoosamy, R. 2008. The morphology and ultrastructure of glandular and non-glandular trichomes of *Pteronia incana* (Asteraceae). *African Journal of Plant Science* **2**: 052-060.

Mayer JLS, Cardoso-Gustavson P, Appezzato-da-Glória B. 2011. Colleters in monocots: New Record for Orchidaceae. *Flora* **206**: 185–190.

Mayer JLS, Carmello-Guerreiro SM, Mazzafera P. 2013. A functional role for the colleters of coffee flowers. *AoB PLANTS* 5:plt029. doi: 10.1093/aobpla/plt029.

McManus JF. 1948. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* **23**: 99-108.

Mercadante-Simões MO, Paiva EAS. 2013. Leaf colleters in *Tontelea micrantha* (Celastraceae, Salacioideae): Ecological, morphological and structural aspects. *Comptes Rendus Biologies* **336**: 400-406.

Miguel EC, Gomes VM, Oliveira MA, Da Cunha M. 2006. Colleters in *Bathysa nicholsonii* K. Schum. (Rubiaceae): Ultrastructure, Secretion Protein Composition, and Antifungal Activity. *Plant Biology* **8**: 715-722.

Morokawa R, Simões AO, Kinoshita LS. 2013. Apocynaceae *s. str.* do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* **64**: 179-199.

Paiva EAS. 2009. Occurrence, structure and functional aspects of the colleters of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae, Caesalpinioideae). *C. R. Biologies* **332**: 1078–1084.

Paiva EAS, Machado SR. 2006. Ontogenesis, structure and ultrastructure of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) colleters. *Rev. Biol. Trop.* **54**: 943-950.

Paiva EAS, Martins LC. 2011. Calycinal trichomes in *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae): ontogenesis, structure and functional aspects. *Australian Journal of Botany* **59**: 91–98.

Paiva EP, Lima MS, Paixão JA. 2009. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. *Revista Iberoamericana de Polímero* **4**: 196-211.

Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* **80**: 223-230.

Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate and high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212.

Ribeiro JF, Walter BM. 2008. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In Sano SM, Almeida SP, Ribeiro JF, eds. *Cerrado: Ecologia e Flora*. Vol. 1. Brasília: Embrapa Cerrados, 151-212.

Sakai WS. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* **48**: 247-249.

Sales MF, Kinoshita LS, Simões AO. 2006. Eight New Species of *Mandevilla* Lindley (Apocynaceae, Apocynoideae) from Brazil. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature* **16**:112-128.

Semir J, Rezende AR, Monge M, Lopes NP. 2011. *As arnicas endêmicas das serras do Brasil: uma visão sobre a biologia e a química das espécies de Lychnophora (Asteraceae)*. Ouro Preto, Editora UFOP.

Simon MF, Grether R, Queiroz LP, Skema C, Pennington RT, Hughes CE. 2009. Recent assembly of the cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by *in situ* evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Science* **106**: 20.359-20.364.

Thomson WW, Healey PL. 1984. Cellular basis of trichomes secretion. In Rodriguez, E.; Healey, P. L. *Biology and chemistry of plant trichomes*. London: Plenum Press, 95-111.

Ueda K, Yoshioka S. 1976. Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *Journal of Cell Science* **21**: 617-631.

Vidal BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Annales d'Histochimie* **15**: 289-296.

Wagner MA, Loeuille BFP, Siniscalchi CM, Melo-de-Pinna GF, Pirani JR. 2014. Diversity of non-glandular trichomes in subtribe Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) and taxonomic implications. *Plant Systematic and Evolution* **300**: 1219-1233.

Watanabe MTC, Roque N, Rapini A. 2009. *Apocynaceae sensu strictum* no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil, incluindo a publicação válida de dois nomes em *Mandevilla* Lindl. *Iheringia, Série Botânica* **64**: 63-75.

Werker E. 2000. Trichome diversity and development. *Advances in Botanical*

Research Incorporating Advances in Plant Pathology **31**: 1-35.

CAPÍTULO 4

Functional groups in Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on morphological and anatomical traits

(Artigo publicado na revista *Australian Journal of Botany* Vol. 62, p 150-163, 2014)

Functional groups in Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae) based on morphological and anatomical traits

Makeli Garibotti Lusa^{A,B}, *Beatriz Appezzato-da-Glória*^A, *Benoît Loeuille*^C, *Giacomo Bartoli*^D and *Daniela Ciccarelli*^{D,E}

^ADepartamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Av. Pádua Dias 11, Universidade de São Paulo, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

^BPrograma de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, C.P. 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

^CDepartamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão 277, 05508-090, São Paulo, SP, Brasil.

^DDipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via Luca Ghini 13, 56126 Pisa, Italia.

^ECorresponding author. Email: dciccarelli@biologia.unipi.it

Short summary: One of the most interesting topics in ecology is how plants are able to live in extreme habitats. By analysing leaf and stem characters of 12 Asteraceae, we were able to circumscribe four groups of plants with peculiar adaptations to the Cerrado Domain and the open areas of the Atlantic Forest. This investigation provides important contributions to the understanding of the responses of Lychnophorinae species to conditions existing in different environments.

ABSTRACT

Lychnophorinae (Asteraceae: Vernoniae) occurs mainly on the Central Brazilian Plateau, especially in areas characterised by intense solar radiation, large daily temperature fluctuations, water scarcity during autumn and winter, and frequent fire. However, a few species of Lychnophorinae, such as *Blanchetia heterotricha* DC., are not restricted to the Cerrado Domain, but can live in open and humid areas of borders of the Atlantic Forest. To understand the mechanisms of Lychnophorinae adaptation to these environmental conditions, habit, leaf and stem functional traits from 12 species were analysed. Leaf and stem samples were processed and stained using standard plant-anatomy methodology. A comparative analysis of functional groups was performed by principal coordinates analysis, which was applied to two matrices of 30 qualitative and five quantitative traits. The multivariate analysis based on qualitative traits highlighted the following four functional types that might be linked to ecological conditions: Group I adapted at open and humid areas of borders of the Atlantic Forest; Group II, with features mostly related to foggy habitats; Group III, exhibiting traits quite adapted to the seasonally dry and variable conditions of the *campos rupestres*; and Group IV, showing the most specialised morphological and anatomical traits, which might be related to the extreme conditions of the *campos rupestres*. These results suggest that these functional groups reflect specific conditions in different environments.

Additional keywords: Cerrado Domain, Compositae, plant adaptation, plant anatomy, plant functional types.

INTRODUCTION

The Lychnophorinae subtribe comprises 18 genera and 104 species, including shrubs, treelets and rarely herbs. It is largely restricted to Brazil, mainly in the Cerrado Domain in areas of *campos rupestres* (rupestrian fields) and savannas of the Central Plateau (Fiaschi and Pirani 2009; Batalha 2011). The most species-rich area is in the Espinhaço Range Mountains in the states of Minas Gerais and Bahia (Loeuille 2011).

Plant species that occupy the Cerrado Domain, especially areas of *campos rupestres*, are often subject to intense solar radiation, great fluctuations in daily temperature, water scarcity during autumn and winter, and the occurrence of fire (Goodland and Ferri 1979; Rizzini 1997; Ribeiro and Walter 2008). To survive in these extreme environmental conditions, plants have developed several structural adaptations, such as well developed underground systems, conspicuous indumenta, the presence of crypts and hypodermal tissue in leaves, and densely imbricated leaves (Vogelmann and Martin 1993; Jordan *et al.* 2005; Hassiotou *et al.* 2009; Appezzato-da-Glória and Cury 2011; Semir *et al.* 2011; Clarke *et al.* 2013). The peculiar ecological conditions of *campos rupestres* probably promoted intense speciation. This could be one reason for the endemism and isolation found in species and genera of this habitat (Giulietti *et al.* 1997; Mansanares *et al.* 2002; Mansanares *et al.* 2007; Rapini *et al.* 2008; Echternacht *et al.* 2011). The Espinhaço Range Region is characterised by a high number of micro- and macroendemic species of which 15 Lychnophorinae taxa are considered rare (Nakajima *et al.* 2009) and 18 are endangered (Fundação Biodiversitas

2005). Interestingly, whereas all late diverging taxa of Lychnophorinae are restricted to the savanna and *campos rupestres*, some of the early diverging taxa (such as *Albertinia brasiliensis* Spreng., *Blanchetia heterotricha* DC., and *Gorceixia decurrens* Baker) are not restricted to the Cerrado Domain, but also occur in very different habitats, namely, the open areas of the Atlantic Forest Domain (Loeuille 2011), where rains are frequent and fire absent (INMET 2013).

The principal aim of this research was to study plant-environment adaptations of species to the peculiar environmental conditions of *campos rupestres*. For this purpose, habit, leaf and stem functional traits were investigated in 12 Lychnophorinae species, 11 which live exclusively in *campos rupestres* and one which is also able to colonise the open areas of the Atlantic Forest. The inclusion of the latter species could provide important contributions to the understanding of the responses of Lychnophorinae species to different environments. It is well known that plant functional traits determine how plants respond to environmental conditions (e.g. Walker 1992; Noble and Gitay 1996; Díaz and Cabido 1997; Díaz *et al.* 2004; Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013). In other words, plant functional types can be defined as groups of plant species sharing similar functioning at the organism level, similar responses to environmental factors, and/or similar roles in ecosystems or biomes (Cornelissen *et al.* 2003). In the present study, we explored the relationship between some Lychnophorinae species and the *campos rupestres* habitat, testing 35 morphological and anatomical functional traits as putative adaptations to environmental conditions. In particular, we attempted to answer the following questions: (1) which functional traits among the 35 selected in this research could be interpreted as an adaptive character to the *campos rupestres* and (2) are the

plant functional types identified among the Lychnophorinae species related to environmental conditions?

MATERIALS AND METHODS

Environmental characterisation

The plants in the present study were collected from two different habitats in Brazil: the *campos rupestres* of the Cerrado Domain, along the Espinhaço Range of Mountains in the states of Minas Gerais and Bahia, considered the centre of diversity of Lychnophorinae (Loeuille 2011), and an open area of secondary forest in the Atlantic Forest Domain (Table 1, Fig. 1).

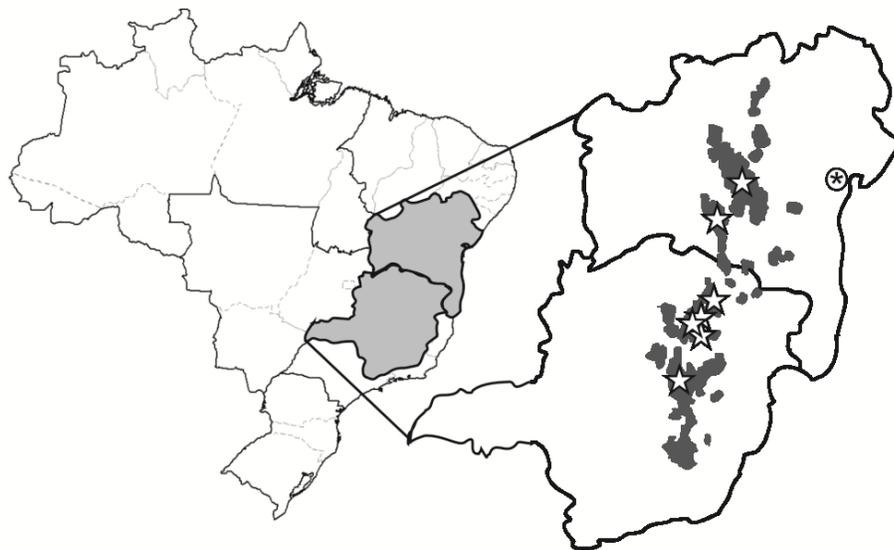


Figure 1. The location of Lychnophorinae collection sites (white stars) in the states of Minas Gerais and Bahia, Brazil, along the Espinhaço Mountain Range (shaded) and in an open area of the Atlantic Forest (asterisk in white circle).

The Cerrado Domain, also known as the Brazilian savanna, is characterised by water scarcity during autumn and winter, when fires can occur. The vegetation of this area is a complex mosaic of different vegetation types such as forest, savannah, and field formations (Ribeiro and Walter 2008) including the *campos rupestres* with occasional rocky outcrops.

The *campos rupestres* in this region experience a mesothermic to tropical climate (Peel *et al.* 2007) with average annual temperatures between 17.4°C and 19.8°C (Giulietti *et al.* 1997). The rainy season lasts 7–8 months (from mid spring to mid autumn), with precipitation of 850–1400 mm; whereas the dry season may last 3–4 months (corresponding to winter), with precipitation of 50–200 mm (Giulietti *et al.* 1997; Gontijo 2008; INMET 2013). The *campos rupestres* usually occur at altitudes above 900 m, in areas characterised by constant winds, extreme temperature variations, warm days and cool nights. In some places, fog occurs, mainly at the highest altitudes of the state of Minas Gerais. The soils are acidic and nutrient-poor, with low organic matter content, and originate from the decomposition of quartzite and arenite in the cracks of outcrops (Ribeiro and Walter 2008). They may have an influence, together with water availability or dispersal and recruitment limitations, about the occurrence of species in the communities of Cerrado Domain (Dantas and Batalha 2011). In general, the availability of water is limited since the rainwater seeps quickly into the rivers because of the shallowness and water retention of the soil (Ribeiro and Walter 2008).

The open areas bordering the secondary forests of the Atlantic Forest Domain of north-eastern Brazil experience a tropical humid climate (Peel *et al.* 2007). These areas occur at low altitudes and are characterised by temperatures between 20 and 30°C, an annual average precipitation of 1.350 mm, regular rain and the absence of fire (INMET 2013).

Table 1. A list of Lychnophorinae species used in the study

Blanchetia heterotricha is more frequently distributed at the borders of secondary forests of the Atlantic Forest, otherwise the other 11 species of Lychnophorinae are endemic from *campos rupestres*

Lychnophorinae species	Species code	Geographic coordinates	Altitude (m)	Voucher
<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H.Rob.	Anthat	16°35'37.6"S, 42°54'07.7"W	673	Loeuille <i>et al.</i> 533 (SPF)
<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	Blahet	12°54'11.1"S, 39°12'06.6"W	193	Loeuille <i>et al.</i> 680 (SPF)
<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.	Chrbif	18°23'49.9"S, 43°21'21.0"W	1819	Lusa <i>et al.</i> 63 (SPF)
<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	Erepol	18°11'52.0"S, 43°37'33.0"W	1141	Loeuille <i>et al.</i> 531 (SPF)
<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J.N.Nakaj. & Semir.	Hetgra	18°07'42.1"S, 43°22'40.5"W	1039	Lusa <i>et al.</i> 61 (SPF)
<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	Lyctom	18°12'52.9"S, 43°35'44.1"W	1362	Loeuille <i>et al.</i> 528 (SPF)
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B.Jones	Lycdia	18°11'52.5"S, 43°37'33.1"W	1141	Loeuille <i>et al.</i> 530 (SPF)
<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H.Rob.	Lyctri	13°31'33.4"S, 41°57'55.5"W	1849	Loeuille <i>et al.</i> 673 (SPF)
<i>Minasia scapigera</i> H.Rob.	Minsca	18°12'52.9", 43°35'44.1"	1362	Loeuille <i>et al.</i> 529 (SPF)
<i>Paralychnophora bicolor</i> (DC.) MacLeish	Parbic	13°31'33.7"S, 41°57'56.7"W	1876	Loeuille <i>et al.</i> 672 (SPF)
<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille	Pipmon	18°23'53,8"S, 43°19'33,0"W	1630	Lusa <i>et al.</i> 62 (SPF)

Table 1. A list of Lychnophorinae species used in the study

Blanchetia heterotricha is more frequently distributed at the borders of secondary forests of the Atlantic Forest, otherwise the other 11 species of Lychnophorinae are endemic from *campos rupestres*

Lychnophorinae species	Species code	Geographic coordinates	Altitude (m)	Voucher
<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	Preeri	19°17'28.1"S, 43°36'01.5"W	1131	Loeuille <i>et al.</i> 524 (SPF)

Plant material

Leaves and stems were sampled from adult plants belonging to 12 species of Lychnophorinae chosen to represent the major clades in the subtribe (Loeuille 2011). Voucher specimens were deposited in the Herbarium SPF - Herbarium of Sao Paulo University (Table 1).

Analyses of three adult individuals for each species were conducted. Samples of leaves and stems were collected for structural analysis and for histochemical tests. A part of each sample was fixed in Karnovsky solution (Karnovsky 1965; modified by using phosphate buffer, pH 7.2) and placed into a vacuum pump to remove air from the tissue. Fixed samples were dehydrated in an ethanol series, embedded in hydroxyethyl methacrylate Leica Histo-resin (Heraeus-Kulzer, Hanau, Hesse, Germany) according to the manufacturer's instructions, and sectioned with steel knives at 5–7 μm thickness on a Leica rotary microtome. For structural analysis, the sections were stained with toluidine blue 0.05% in citrate-phosphate buffer, pH 4.5 (Sakai 1973), and mounted in synthetic resin Entellan Merck (Darmstadt, Hesse, Germany).

For the histochemical analyses, fresh material was tested for terpenoids using NADI reagent (David and Carde 1964) and for flavonoids using aluminium chloride to induce fluorescence under UV light (Charrière-Ladreix 1976). Additionally, the embedded material – as described above – was tested for pectic carbohydrates using ruthenium red 0.01% (Chamberlain 1932) and for general phenolic compounds using ferric chloride 3% (Johansen 1940). Observations and records were made using a Leica DM LB microscope equipped with Dialux epifluorescence (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) coupled to a Leica DC 300F video camera. To visualise cellulosic thickening of cell walls, histological slides were observed under polarised light using a Zeiss Axioplan Microscope equipped with crossed polarisers (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Germany) coupled to a Canon EOS 60D (Tokyo, Japan) digital camera.

Trait measurements

Thirty qualitative and five quantitative functional traits regarding habit, leaf and stem morpho-anatomy, and presence or absence of metabolic classes were scored for 12 species (Table 2). These traits were selected because they were considered good correlates of plant function; i.e. responsible for responses or effects at the ecosystem or biome scale (Cornelissen *et al.* 2003). Anatomic features were obtained from fully expanded leaves, which were analysed in the median region of the blade and stems (from apical to median regions of the axis or of the branches). The number of evaluated nodes varied among species (see Appendix 1), depending on length of internodes, differentiation of secondary structure, and thickening of branches. Because indumentum varied with leaf age, partly expanded and fully expanded leaves were considered for qualitative traits related to indumentum form and

histochemistry. Partly expanded leaves were sampled at an intermediate stage between primordia and fully expanded leaves. Quantitative measurements were obtained from three fully expanded leaves from three individuals of each species. The leaf thickness was measured from adaxial to abaxial epidermis on leaf cross-sections. To assess midrib thickness, measurements were obtained from sections of the middle part of the leaf blade (nine measurements for each species). To assess internerval thickness, measurements were obtained from three sectors of the middle part of the leaf blade without vascular bundles, where only the parenchymal tissues were present (27 measurements of each species). Furthermore, epidermal cuticle and external cell wall thickness were measured on the same internerval regions. Functional traits were assessed using a Leitz DIAPLAN light microscope (Wetzlar, Germany) coupled to a DFC 420 Leica video camera (Leica Microsystems); the Leica Application Suite Version 3.4.0 (Leica Microsystems) was used.

Statistical analyses

To identify major trends in the grouping of the Lychnophorinae according to their morphological and anatomical similarities, Principal Coordinates Analysis (PCoA) using GINKGO software (a statistical module of the VEGANA package, De Cáceres *et al.* (2003) was applied to two matrices: a matrix of 30 qualitative traits by 12 taxa (Appendix 2), and a matrix of five quantitative traits by 12 groups (Appendix 3). For the two matrices, we used the Bray–Curtis index to obtain similarity matrices. The quantitative matrix was square-root transformed before the Bray–Curtis measure was applied. PCoA is an ordination method that enables visualisation of the position of the samples in relation to each other in reduced numbers of dimensions (Podani 2007).

A preliminary analysis indicated which traits were linearly dependent; subsequent analyses therefore used matrices that were reduced to independent traits only. This ordination identified functional groups among the species analysed.

Table 2. Traits measured in Lychnophorinae species

Scales of measurement were originally binary (bin), categorical (cat) or continuous (cont). Abbreviations: AB, abaxial leaf face; AD, adaxial leaf face

Code	Trait	Type of variable	Description of classes in matrix	Ecological correlate
1	Leaf phenology	cat	1 – evergreen; 2 – semi-deciduous; 3 – deciduous	Nutrient- and water-use strategy (Perez-Harguindeguy <i>et al.</i> 2013)
2	Leaf rolling	cat	1 – absent; 2 – present	Drought resistance (Navarro <i>et al.</i> 2006)
3	Overlapping leaf	cat	0 – absent; 1 – present in apex; 2 – present in adult stem	Protection against fire (Givnish <i>et al.</i> 1986; Smith and Young 1987); increase the volume of impounded rainwater (Givnish <i>et al.</i> 1986)
4	Crypts in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Leaf transpiration and water loss reduction (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008); carbon dioxide diffusion from abaxial to adaxial surface (Hassiotou <i>et al.</i> 2009)
5a	Indumentum in partly expanded leaf	cat	0 – absent; 1 – low; 2 – high	Leaf transpiration and water loss reduction (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008)
5b	Indumentum in fully expanded leaf	cat	0 – absent; 1 – low AB; 2 – high AB; 3 – low AB/AD; 4 – high AB/AD	Leaf transpiration and water loss reduction (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008)
5c	Coating stem	cat	0 – remaining leaf bases; 1 – short trichomes; 2 – high trichomes	Protection against fire (Givnish <i>et al.</i> 1986; Smith and Young 1987); water loss reduction (Turner 1994; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008)
6	Habit	cat	0 – subshrub; 1 – shrub; 2 – treelet; 3 – rosette	Several ecophysiological adaptations to the environment (Givnish <i>et al.</i> 1986; Smith and Young 1987; Perez-Harguindeguy <i>et al.</i> 2013)
7a	Stomata in leaf	bin	0 – present in AD/AB; 1 – present in AB	High luminosity and water loss reduction (Turner 1994; Scatena <i>et al.</i> 2005)
7b	Stomata position in leaf	cat	1 – sunken; 2 – same level epidermis; 3 – elevated	Transpiration and water loss reduction (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008)
7c	Stomata position in stem	Cat	0 – absent; 1 – same level epidermis; 2 – elevated	Transpiration and water loss reduction (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Rotondi <i>et al.</i> 2003; Jordan <i>et al.</i> 2008)
8a	Chloroplasts in leaf epidermis	Bin	0 – absent; 1 – present	Photosynthetic efficiency (Cox <i>et al.</i> 1987; Sakurai <i>et al.</i> 2005; Fujinami <i>et al.</i> 2011)
8b	Chloroplasts in stem epidermis	Bin	0 – absent; 1 – present	Photosynthetic efficiency (Cox <i>et al.</i> 1987; Sakurai <i>et al.</i> 2005; Fujinami <i>et al.</i> 2011)

Table 2. Traits measured in Lychnophorinae species

Scales of measurement were originally binary (bin), categorical (cat) or continuous (cont). Abbreviations: AB, abaxial leaf face; AD, adaxial leaf face

Code	Trait	Type of variable	Description of classes in matrix	Ecological correlate
9	Hypodermis in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Leaf thickening; water store (Turner 1994)
10a	Bundle-sheath extension in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Strength, stiffness and toughness of plant tissues (Turner 1994)
10b	Bundle-sheath extension - cell wall thickness	cat	1 – cellulosic; 2 – pectic; 3 – both cellulosic and pectic	Water conservation (Bosabalidis and Kofidis 2002); increasing sclerenchyma fraction: strength, stiffness and toughness (Turner 1994)
11	Aquifer parenchyma in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Resistance to drought stress (Fahn and Cutler 1992)
12a	Carbohydrates in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Water conservation (Bosabalidis and Kofidis 2002)
12b	Carbohydrates in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Water conservation (Bosabalidis and Kofidis 2002)
13a	Terpenoids in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Thermotolerance (Singsaas et al. 1997; Sharkey et al. 2001)
13b	Terpenoids in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Thermotolerance (Singsaas et al. 1997; Sharkey et al. 2001)
14a	Flavonoids in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Protection against UV-B radiation (Kofidis et al. 2003)
14b	Flavonoids in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Protection against UV-B radiation (Kofidis et al. 2003)
15a	Phenolic compounds in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Protection against UV-B radiation; water conservation (Bosabalidis and Kofidis 2002; Kofidis et al. 2003)
15b	Phenolic compounds in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Protection against UV-B radiation; water conservation (Bosabalidis and Kofidis 2002; Kofidis et al. 2003)
16a	Crystals in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Plant protection, ion balance, tissue support/plant rigidity, light gathering and reflection (Franceschi and Nakata 2005)
16b	Crystals in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Plant protection, ion balance, tissue support/plant rigidity, light gathering and reflection (Franceschi and Nakata 2005)

Table 2. Traits measured in Lychnophorinae species

Scales of measurement were originally binary (bin), categorical (cat) or continuous (cont). Abbreviations: AB, abaxial leaf face; AD, adaxial leaf face

Code	Trait	Type of variable	Description of classes in matrix	Ecological correlate
17a	Sclereids in leaf	bin	0 – absent; 1 – present	Increasing sclerenchyma fraction: protection, strength, stiffness and toughness of plant tissues (Turner 1994); light distribution within the mesophyll (Karabourniotis 1998; Bosabalidis and Kofidis 2002)
17b	Sclereids in stem	bin	0 – absent; 1 – present	Increasing sclerenchyma fraction: protection, strength, stiffness and toughness of plant tissues (Turner 1994); light distribution within the chlorophyllian tissue (Karabourniotis 1998; Bosabalidis and Kofidis 2002)
18	Spaces in cork of stem	bin	0 – absent; 1 – present	Protection against fire; rainwater retention (Givnish et al. 1986)
CT	Cuticle thickness (internerval region)	cont	µm	UV-B protection; water conservation (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002)
OW	Epidermic outer cell-wall thickness (internerval region)	cont	µm	UV-B protection; water conservation (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002)
ET	Epidermal thickness (internerval region)	cont	µm	UV-B protection; prevention of insect mouth plant insertion; water and nutrient conservation (Turner 1994)
LT	Leaf thickness (midrib)	cont	µm	Prevention of the cracking; insect mouth plant insertion and reduction of their digestibility; water and nutrient conservation (Turner 1994)
IT	Leaf thickness (internerval region)	cont	µm	Prevention of the cracking; insect mouth plant insertion and reduction of their digestibility; water and nutrient conservation (Turner 1994)

RESULTS

Multivariate analyses using qualitative and quantitative data enabled the distinction of functional groups among Lychnophorinae species (Figs 2, 3, Tables 3, 4). The PCoA of qualitative data indicated the presence of four clearly distinguished functional groups (Fig. 2, Table 3). The first PCoA axis (PCoA1) explained ~65% of total variation, whereas the second axis (PCoA2) accounted for ~17% of total variation. Six traits were strongly correlated with the first two axes (Pearson's coefficient >0.8): habit type, overlapping leaves, the presence of sclereids and crypts in leaves, the presence of chloroplasts in the leaf epidermis and the distribution of stomata in leaves. *Blanchetia heterotricha* (Group I) was at the lower end of the first axis (Fig. 2), because of its subshrub habit and absence of overlapping leaves, absence of crypts and sclereids in leaves (Table 3); *Minasia scapigera* and *Prestelia eriopus* (Group IV) were at the opposite end (Fig. 2) with rosulate habit, where all leaves were overlapped and with the presence of sclereids in leaves (Table 3). Species of Group II were distinguished from the other groups by leaves without crypts and the presence of chloroplasts in leaf epidermis (except *Eremanthus polycephalus*), while all species of the Group III showed crypts in leaves and no chloroplasts in leaf epidermis (Table 3).

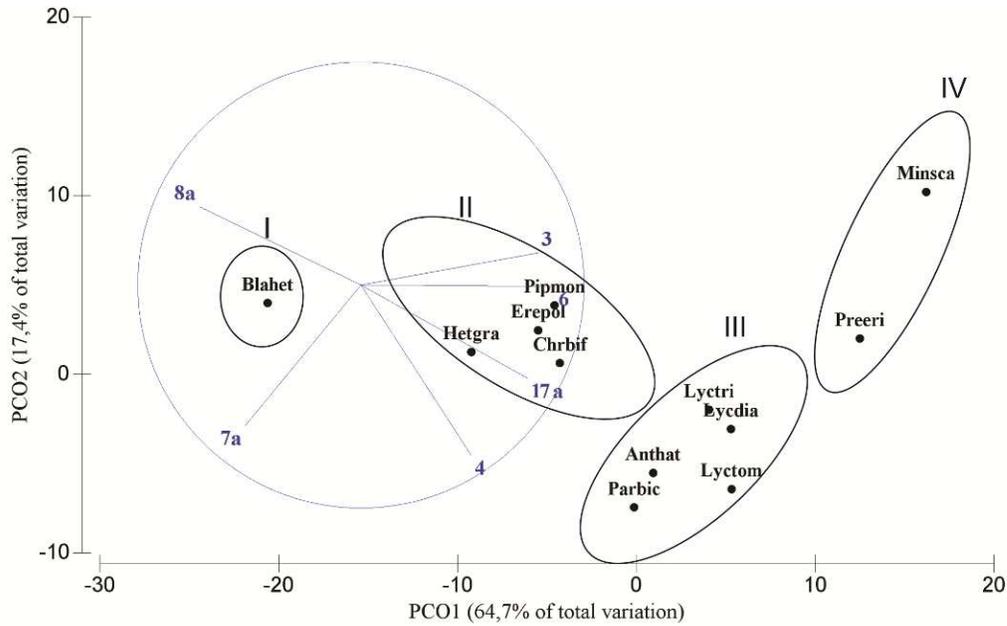


Fig. 2. Principal coordinates analyses (PCoA) of qualitative traits, based on morphological and anatomical characteristics in Lychnophorinae. Traits highly correlated with the first two axes (Pearson's coefficient >0.8) were habit type (6), overlapping leaves (3), sclereids in the leaf (17a), chloroplasts in the leaf epidermis (8a), crypts in the leaf (4) and the distribution of stomata in the leaf (7a). The four groups of plants (I, II, III, IV) distinguished by the PCoA are indicated by ellipses.

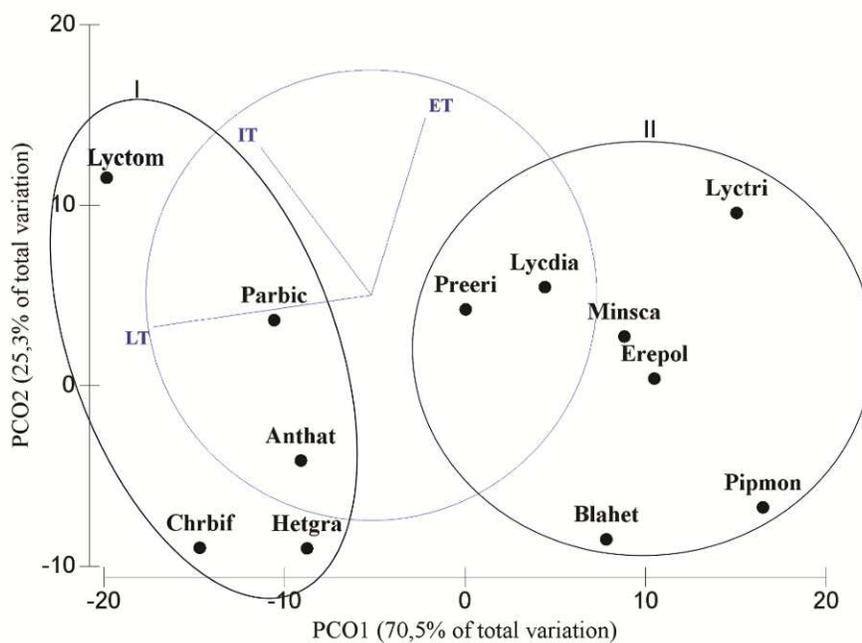


Fig. 3. Principal coordinates analyses (PCoA) of quantitative traits, based on anatomical characteristics in Lychnophorinae. Traits highly correlated with the first two axes (Pearson's coefficient >0.8) were leaf thickness in midrib (LT), in internodal region (IT), and in epidermis (ET). The two groups of plants (I, II) distinguished by the PCoA are indicated by ellipses.

Table 3. Functional groups of Lychnophorinae species distinguished according to principal coordinates analysis, on the basis of qualitative traits

The name of species is abbreviated according to Table 1. (+) = presence; (-) = absence

Trait	Group I Blahet	Group II Chrbif, Erepol, Hetgra, Pipmon	Group III Anthat, Lycdia, Lyctom, Lyctri, Parbic,	Group IV Minsca, Preeri
Habit	Subshrub	Treelet or shrub	Treelet	Rosette
Overlapping leaves	(-)	(+/-) Apex	(+/-) Apex and/or adult stem	(+) Apex and adult stem
Sclereids in leaf	(-)	(+/-)	(+)	(+)
Chloroplasts in leaf epidermis	(+)	(+/-)	(-)	(-)
Crypts in leaf	(-)	(-)	(+)	(+/-)
Distribution of stomata in leaf	Abaxial face	Abaxial face	Abaxial face	Abaxial and/or adaxial face

Table 4. Functional groups of Lychnophorinae species distinguished according to principal coordinates analysis, on the basis of quantitative traits

For each trait, mean value \pm s.d. are reported. Trait abbreviations are explained in Table 2. Species names are abbreviated according to Table 1

Trait	Group I Anthat, Chrbif, Hetgra, Lyctom, Parbic	Group II Blahet, Erepol, Lycdia, Lyctri, Minsca, Pipmon, Preeri
LT	2424.8 \pm 129.0	832.1 \pm 64.4
IT	429.2 \pm 38.8	219.7 \pm 23.8
ET	31.6 \pm 3.7	50.8 \pm 5.6

Regarding habit, Group I comprised subshrub plants (Fig. 4a), Group II shrubs (Fig. 4b, c) or treelets, whereas Group III comprised only treelets (Fig. 4d, e), and Group IV rosulate plants (Fig. 4f, g). Overlapping leaves were absent in Group I (Fig. 5a) and in Group II (except *Chronopappus bifrons*, Fig. 5b), whereas they were present in Group III (except *Paralychnophora bicolor*, Fig. 5c), and in Group IV (Fig. 4f, g). In Group II, if present, overlapping leaves occurred only at the apex (Fig. 5b), whereas in several species of Group III (*Lychnophora diamantinana*, *L. tomentosa*, *L. triflora*) they occurred along the adult branches (Fig. 5c); and, finally, in Group IV the overlapping leaves always enrobed completely the apex and stems (Fig. 4f, g). Sclereids were observed in the stems of almost all groups. In addition, this character was absent in leaves of Group I (Fig. 6a) and Group II (except *E. polycephalus*), whereas it always occurred in Group III (Fig. 6b) and in Group IV. If present, sclereids occurred mainly in aquiferous parenchyma, including the aquiferous hypodermis (Fig. 6c). Leaf crypts were absent in Group I (Fig. 6d) and in Group II, whereas they were present in Group III (Fig. 6c) and only in *P. eriopus* of Group IV. Chloroplasts were observed in the leaf epidermis in Group I (Fig. 6d) and in Group II (Fig. 6e–f) (except *E. polycephalus*, Fig. 6g), whereas they were absent in Group III and in Group IV. The leaves of all species except *Minasia scapigera* (Group III) were hypostomatic (i.e. the stomata were restricted to the abaxial surface). *Minasia scapigera* (Fig. 6h) was amphistomatic.

The PCoA performed on quantitative traits identified two groups of species (Fig. 3, Table 4). The first PCoA axis explained ~70% of total variation, whereas the second axis accounted for ~25%. Three traits were highly correlated with the first two axes (Pearson's

coefficient >0.8): midrib leaf thickness (LT), internerval leaf thickness (IT), and epidermal leaf thickness (ET). PCoA1 was mostly correlated with LT, in fact Group I (see Table 4 for species composition) was located at the left end of PCoA1 and exhibited higher values of LT (Fig. 7a). In contrast, Group II (see Table 4 for species composition) occurred at the right end of axis 1 (Fig. 3), and were characterised by lower values of LT (Fig. 7b). Conversely, IT and ET were correlated with PCoA2. In fact, species of both groups with positive values of PCoA2 were characterised by the highest values for IT and ET (Fig. 7a, c), whereas species with negative values of PCoA2 exhibited the lowest values of IT and ET (Figs 3, Figs 7b, d, Appendix 3). The functional groups obtained from the quantitative analysis were not equivalent of the four groups from the analysis of qualitative traits. In fact, species of Groups II and III of qualitative analysis were distributed into both groups of quantitative analysis. On the other hand, species of Groups I and IV from the analysis of qualitative traits were clustered in Group II of quantitative analysis (Figs 2, 3).



Fig. 4. Distinctive morphological characteristics of Lychnophorinae: habit (a qualitative trait). (a) *Blanchetia heterotricha*. (b) *Piptolepis monticola*. (c) *Chronopappus bifrons*. (d) *Lychnophora triflora*. (e) *L. diamantinana*. (f) *Prestelia eriopus*. (g) *Minasia scapigera*. (a) Subshrub habit. (b, c) Shrub. (d, e) Treelet. (f, g) Rosette. Note the remaining leaf bases on stems in *f* (arrow).

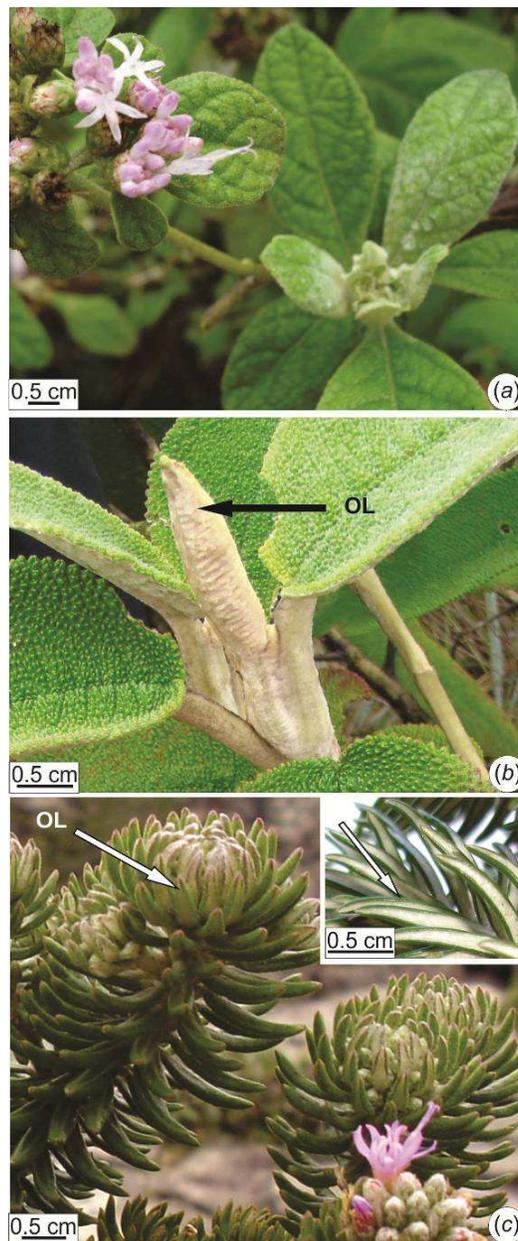


Fig. 5. Distinctive morphological characteristics of Lychnophorinae: overlapping leaves (OL). (a) Stem apex without overlapping leaves in *Blanchetia heterotricha*. (b) OL only on the stem apex (black arrow) in *Chronopappus bifrons*. (c) OL on the stem apex and along adult branches (white arrow) in *Lychnophora triflora*. Inset: detail of the revolute margin (abaxially curled) of the overlapping leaves (white arrow) of *L. triflora*.

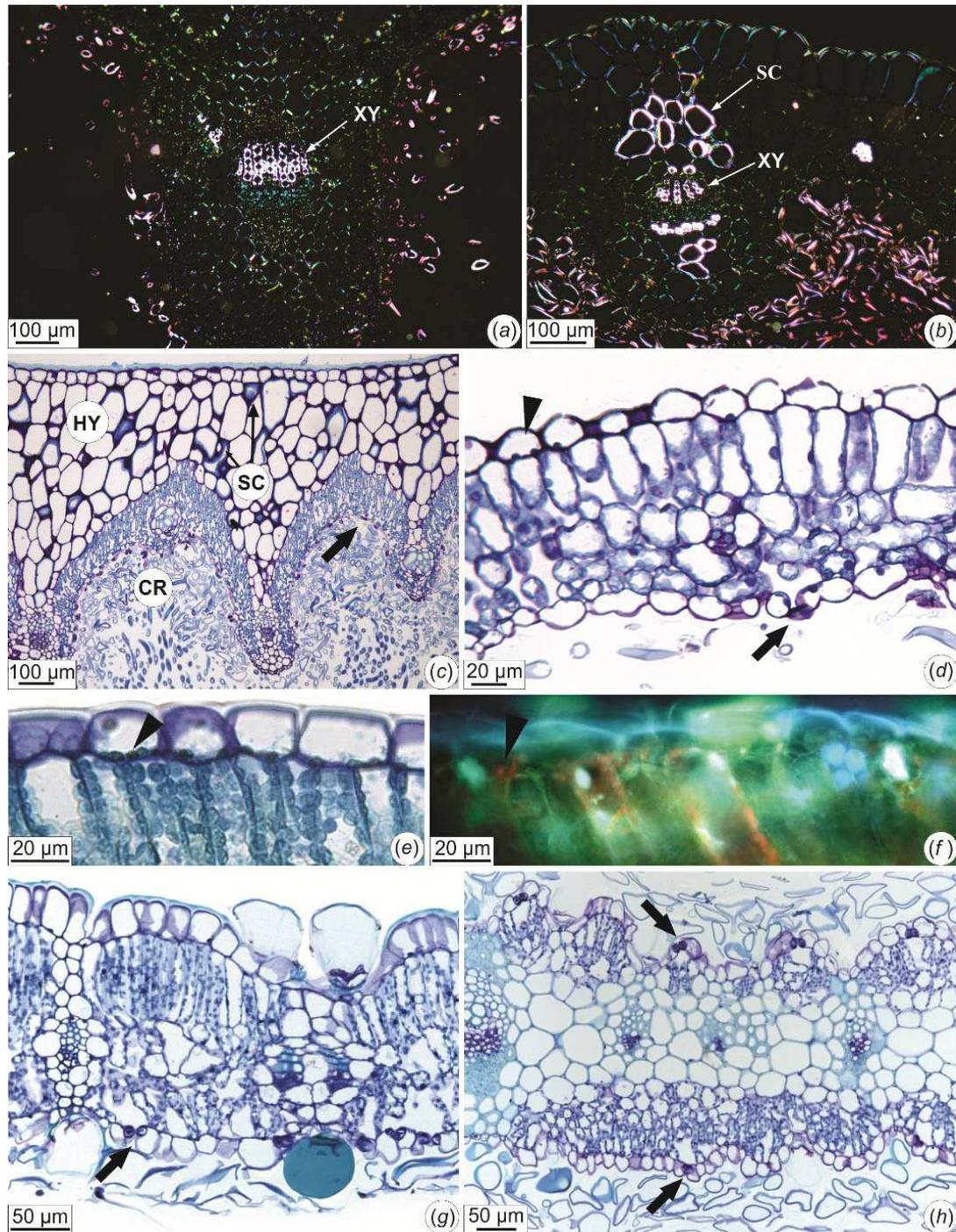


Fig. 6. Distinctive anatomical characteristics (qualitative traits) of Lychnophorinae: transverse sections of leaves. (a, b) Midrib under polarised light, showing (a) the absence of sclereids in *Blanchetia heterotricha* and (b) their presence in *Lychnophora triflora*. (c,

d) Mesophyll with crypts and hypodermis (c) with sclereids in *L. tomentosa*, and (d) their absence in *B. heterotricha*. Note stomata (arrow) in (c) *L. tomentosa* and in (d) *B. heterotricha*, and chloroplasts in the epidermis (arrowhead) in *B. heterotricha* (d). (e, f) Epidermis with chloroplasts (arrowhead) in *Chronopappus bifrons*, (e) under light microscopy and (f) natural fluorescence under fluorescence microscopy. (g) *Eremanthus polycephalus*, showing epidermis without chloroplasts and with stomata (arrow) on the abaxial surface. (h) *Minasia scapigera* evidencing epidermis with stomata (arrow) on the adaxial and abaxial surfaces. CR = crypts; HY = hypodermis; SC = sclereids; XY = xylem.

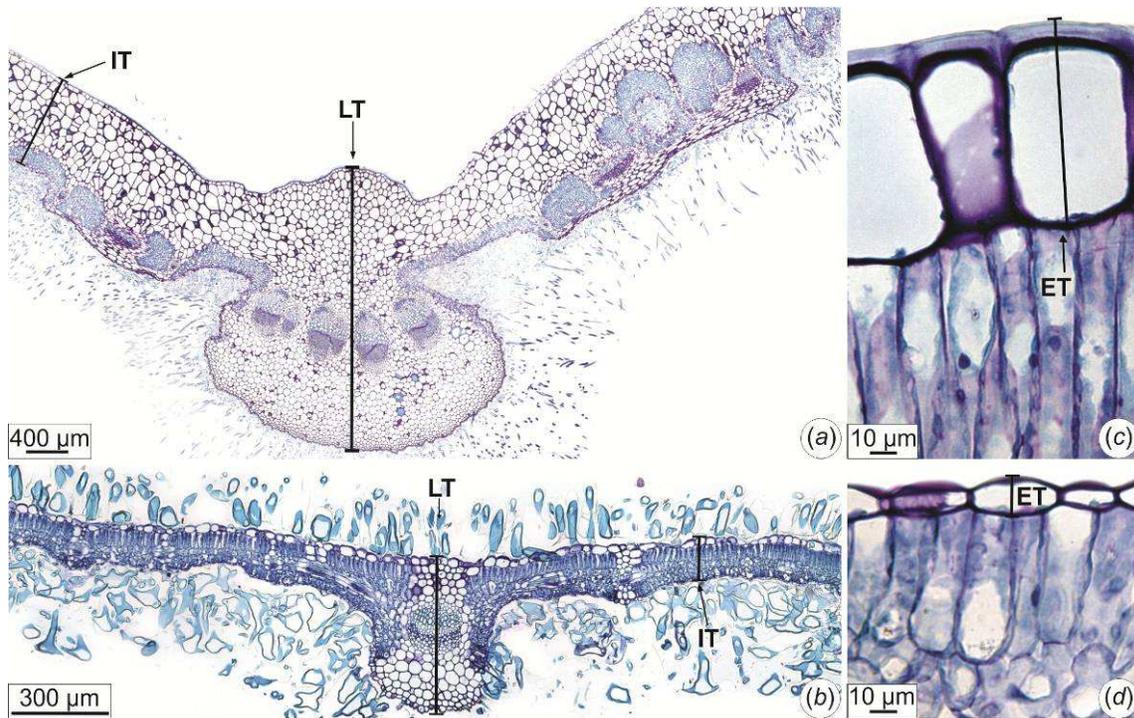


Fig. 7. Distinctive anatomical characters (quantitative traits) of Lychnophorinae. Transverse sections of leaves showing the position of the measurements of leaf thickness in midrib region (LT) and in internerval region (IT) in (a) *Lychnophora tomentosa* and in (b) *Piptolepis monticola*; and epidermal thickness (ET) in (c) *L. triflora* and in (d) *Blanchetia heterotricha*.

DISCUSSION

The multivariate analysis performed on 35 functional traits of 12 Lychnophorinae taxa showed that six qualitative and three quantitative traits were significant in grouping the species. The majority of qualitative traits (habit type, overlapping leaves, the presence of sclereids and crypts in the leaf and the distribution of stomata in the leaf) might be seen as putative ecological adaptations to the peculiar environmental conditions of the Cerrado Domain, especially of *campos rupestres*. Other traits, such as chloroplasts in the leaf epidermis, could be correlated with environments subject to low irradiance owing to the higher frequency of cloudiness. These environmental features are most common in borders of secondary forests of the Atlantic Forest and in higher altitudes of the Espinhaço Range of Mountains, especially in Minas Gerais State.

The Lychnophorinae species analysed exhibited a variable habit from subshrubs, shrubs or treelets to rosulate plants. Rosulate habit was observed only in Group IV, suggesting the highest degree of specialisation in Lychnophorinae for protection of the apical meristem and the stem axis from biotic and abiotic damage. Givnish *et al.* (1986) observed that rosulate plants may have three functions, namely, protecting buds and young leaves from UV radiation and leaching, insulating terminal buds from fire and increasing the volume of impounded rainwater, which would also protect the buds against fire and grazing. All these abiotic factors are important in *campos rupestres*, and it appears clear that rosulate plants are highly specialised in overcoming these adversities.

The trait of overlapping leaves was observed on the apex of stems in some species, protecting the apical buds; however, in other species, this trait also occurred on adult stems and presumably also protected axillary meristems. Overlapping leaves and remaining leaf sheath or bases and the woolly indumentum (found in rosulate species of Group IV) are the principal forms of protection of apical buds against fire on apical sprouting in rosulate plants, according to Clarke *et al.* (2013).

Sclereids were present in the parenchymatic tissues of stems of almost all Lychnophorinae species analysed, but occurred only in some species in the leaf, mainly in plants with thick leaves. The increasing sclerenchyma fraction enhances the protection, strength, stiffness and toughness of plant tissues; consequently, these tissues are less liable to be damaged by a given agent (Turner 1994). Moreover, sclereids were considered lightly distributed within the mesophyll, especially under drought stress conditions (Karabourniotis 1998; Bosabalidis and Kofidis 2002). Sclereids could play a role in light reflection in chlorenchyma, as argued by Jordan *et al.* (2005). However, sclereids could also play a structural role in supporting the parenchymatic tissue and preventing tissue collapse after variations in hydric state under drought stress conditions, as occurs in the water storage tissues of other species (Oliveira and Sajo 1999; Stern *et al.* 2004; Versieux *et al.* 2010). In Lychnophorinae, sclereids occur mainly in colorless parenchyma, including the hypodermis; thus in our opinion, in these species sclereids can act structurally preventing the collapse of these type of cells, but also can contribute to reflect the light to chlorenchyma in thickened leaves.

The presence of crypts protected by trichomes is a known xerophytic feature involved in the reduction of leaf transpiration and water loss (Turner 1994; Rotondi *et al.*

2003; Jordan *et al.* 2008; Bartoli *et al.* 2013, 2014). Stomatal crypts can also facilitate the diffusion of carbon dioxide from the abaxial surface to adaxial palisade cells in thick leaves (Hassiotou *et al.* 2009). In the Lychnophorinae subtribe, abaxial crypts were observed in the thickest leaves, where this trait not only might be related to the diffusion of carbon dioxide, but also might play a role in water economy regulation.

In the analysed species, the stomata in the leaves are predominantly distributed on the abaxial face, except in *M. scapigera*. The hypostomy is a known feature of species that inhabit *campos rupestres* and the Cerrado Domain (Marques *et al.* 2000; Scatena *et al.* 2005; Bieras and Sajo 2009). The occurrence of stomata on both leaf surfaces of *M. scapigera* (Group IV) may be related to the angle of inclination of the leaves, which are organised in an apical rosette. The isobilateral and amphistomatous leaf of *M. scapigera* can intercept sunlight on both surfaces, as well as reduce light interception under high irradiance through a more vertical leaf orientation, thereby protecting the leaves against damage caused by high irradiance, as observed by James and Bell (2000) and Falster and Westoby (2003). Furthermore, amphistomy allows leaves to be thick by increasing the leaf conductance to CO₂ (see Jordan *et al.* 2014; and references cited therein). Last, amphistomy is a common feature in plants of xeric habitats (Fahn and Cutler 1992) as observed in *M. scapigera*.

The presence of chloroplasts in leaf epidermis was a qualitative trait that characterised species of Groups I and II (except *E. polycephalus*). This feature can occur in aquatic plants as a way to improve photosynthetic efficiency underwater (Hough and Wetzel 1977; Sakurai *et al.* 2005; Fujinami *et al.* 2011; Lusa *et al.* 2011), whereas it is an

unusual feature in terrestrial plants, occurring mostly in ferns (Cox *et al.* 1987) that inhabit shaded and wet places. In the Lychnophorinae, this trait was observed in *B. heterotricha* (Group I), which occurs in areas of borders of secondary forests of the Atlantic Forest, and in *C. bifrons*, *Piptolepis monticola* and *Heterocoma gracilis* (species of Group II) that occur in close geographic locations. The natural habitats of the species of Group II are frequently foggy, especially in cold days during winter and spring, and the presence of chloroplasts in epidermis could improve light use for photosynthesis under this climatic condition. In plants with epidermal chloroplasts, these chloroplasts can be protected under strong light by changes in their orientation along anticlinal cell walls, whereas the chloroplasts move towards the periclinal cell wall under weak light conditions (Takagi 2003). The leaf epidermal cells of Group I and II species present chloroplasts along the periclinal cell walls, most likely because we collected the botanical material on rainy (Group I) and foggy (Group II) days.

The PCoA of qualitative traits provided evidence for distinguishing functional types. *Blanchetia heterotrichia* (Group I) seems to be adapted at open and humid areas of borders of the Atlantic Forest, exhibiting subshrub by habit and absence of sclereids, leaf crypts and overlapping leaves. These traits might be explained by the location of *B. heterotricha*, which is characterised by regular rainfall, absence of fire, and higher water soil retention (INMET 2013). Almost all species belonging to Group II are characterised by leaves without crypts and with chloroplasts in epidermal cells. The species in Group II are typical of foggy habitats. Group III is only formed by species with crypts and sclereids in leaves, and seems to be quite adapted to the stressful conditions of *campos rupestres*. Group IV is constituted by rosulate plants showing overlapping leaves with crypts and

sclereids. Interestingly, these species share some traits (i.e. pseudo-trunk covered with the leaf-sheaths remains, hairiness, tightly furled leaf rosettes, water-storage strategies, epidermal cell wall and cuticle thickenings, sclerified elements) with other taxa of angiosperms adapted to live in *campos rupestres* of the Espinhaço Mountain Range, such as Iridaceae (Chueiri-Chiaretto 1984), Velloziaceae (Mello-Silva 1990), Xyridaceae (Sajo *et al.* 1995), and Eriocaulaceae (Giulietti *et al.* 1997; Scatena *et al.* 2005) or with Asteraceae of high altitude habitats (Baruch 1979; Baruch and Smith 1979; Smith and Young 1987). All these traits can strengthen the adaptive ability of plant species of Group IV. Consequently, with respect to the other groups, the Group IV seems to be the most adapted type to the prohibitive environmental conditions of *campos rupestres*.

Similarly to the qualitative characters, the three quantitative traits – LT, IT, and ET – could also be seen as putative ecological adaptations to the *campos rupestres*. The general thickness or toughness of a leaf is related to sclerophylly, which clearly depends on leaf anatomy, i.e. thick cuticle, thick epidermal cells and sclerification (Turner 1994). These characteristics are frequent in evergreen plants and provide protection against UV-B penetration, prevent cracking, defend against herbivores, prevent insect mouth insertion and reduce plant digestibility, but can also play a role in terms of water and/or nutrient conservation (Turner 1994; Bosabalidis and Kofidis 2002; Kofidis *et al.* 2003). The PCoA based on quantitative data evidenced two main functional types that were distinguished mainly by LT: Group I (*Anteremanthus hatschbachii*, *C. bifrons*, *H. gracilis*, *Lychnophora tomentosa*, and *P. bicolor*), more specialised, with higher values of LT; and group II (*B. heterotrica*, *E. polycephalus*, *L. diamantinana*, *L. triflora*, *M. scapigera*, *P. monticola*, and

P. eriopus), less adapted, with lower values of LT. These functional types were more heterogeneous and seem without a strong link to the environmental conditions or to a particular habitat, but possibly could vary between specimen of same species in a population. So they did not appear useful for the aims of the present research. For future analyses, enlarging sampling effort and considering populations and more quantitative traits could be taken into account.

In the present study, the qualitative traits gave more convincing results than did quantitative characters, because they are less susceptible to variation within a species or between different species. In fact, qualitative traits provided statistically significant differences that enabled the identification of different functional groups in Lychnophorinae species that can be interpreted as morphological and anatomical adaptations to the *campos rupestres* of the Cerrado Domain (where drought and fire are important limiting factors during the dry season), and to the open areas of the Atlantic Forest Domain (characterised by regular rainfall, absence of fire and higher water soil retention).

In conclusion, we can answer the questions posed at the beginning of this paper.

(1) The most significant features in Lychnophorinae species in terms of circumscribing the identified functional groups were habit type, the presence of overlapping leaves, the presence of sclereids and crypts in the leaf, the presence of chloroplasts in the leaf epidermis, and the distribution of stomata in the leaf. These traits could be seen as plant adaptations to the environment where the species occur, and the absence of a trait or the occurrence of a less adaptive character reflects less drastic environmental conditions (i.e. *B. heterotricha*).

(2) The multivariate analysis, especially on the basis of qualitative traits, provided evidence that four functional types are likely to be related to the ecological conditions, as follows: Group I, adapted at open and humid areas of borders of the Atlantic Forest; Group II, with features mostly related to foggy habitats; Group III, exhibiting traits quite adapted to *campos rupestres*, and Group IV, presenting the most specialised morphological and anatomical traits, which might be related to the extreme conditions of the *campos rupestres*. These results suggest that these functional groups reflect specific conditions in different environments.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Professor Laura M. C. Forino (University of Pisa, Italy) for her useful suggestions, Dr Monica Ruffini Castiglione (University of Pisa, Italy) for her technical and scientific support, and Professor Massimo D'Orazio (University of Pisa, Italy) for his valuable assistance with polarised light microscopy. We thank the IEF-MG for their logistical support with the plant collection and FAPESP (São Paulo Research Foundation) for providing financial support (Thematic Project Proc. no. 2010/51454–3) and grants for the first (2010/02085–5 and 2012/16071–1) and second (302776/2010–9) author. The paper is part of the doctoral thesis of M. G. Lusa.

REFERENCES

- Appezato-da-Glória B, Cury G (2011) Morpho-anatomical features of underground systems in six Asteraceae species from the Brazilian Cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **83**, 981-991. [doi:10.1590/S0001-37652011005000018](https://doi.org/10.1590/S0001-37652011005000018)
- Bartoli G, Bottega S, Forino LMC, Ruffini Castiglione M, Tagliasacchi AM, Grilli I, Spanò C (2013) Morpho-physiological plasticity contributes to tolerance of *Calluna vulgaris* in an active geothermal field. *Australian Journal of Botany* **61**, 107-118. [doi:10.1071/BT12174](https://doi.org/10.1071/BT12174)
- Bartoli G, Bottega S, Forino LMC, Ciccarelli D, Spanò C (2014) Plant adaptation to extreme environments: the example of *Cistus salviifolius* of an active geothermal alteration field. *Comptes Rendus Biologies* **337**, 101-110. [doi:10.1016/j.crv.2013.12.005](https://doi.org/10.1016/j.crv.2013.12.005)
- Baruch Z (1979) Elevational differentiation in *Espeletia schultzei* (Compositae), a giant rosette plant of the Venezuelan Paramos. *Ecology* **60**, 85-98. [doi:10.2307/1936471](https://doi.org/10.2307/1936471)
- Baruch Z, Smith AP (1979) Morphological and physiological correlates of niche breadth in two species of *Espeletia* (Compositae) in the Venezuelan Andes. *Oecologia* **38**, 71-82.
- Batalha MA (2011) O Cerrado não é um bioma. *Biota Neotropica* **11**: 1-4. [doi:10.1590/S1676-06032011000100001](https://doi.org/10.1590/S1676-06032011000100001)
- Bieras AC, Sajo MG (2009) Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. *Trees* **23**, 451-471. [doi:10.1007/s00468-008-0295-7](https://doi.org/10.1007/s00468-008-0295-7)
- Bosabalidis A, Kofidis G (2002) Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* **163**, 375-379. [doi:10.1016/S0168-9452\(02\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00135-8)
- Chamberlain CJ (1932) 'Methods in Plant Histology'. (University of Chicago Press: Chicago)
- Charrière-Ladriex Y (1976) Repartition intracellulaire du sécrétat flavonique de *Populus nigra* L. *Planta* **129**, 167-174. [doi:10.1007/BF00390024](https://doi.org/10.1007/BF00390024)
- Chueiri-Chiaretto IA (1984) Estudos morfo-anatômicos da folha de espécies de *Trimesia* (Iridaceae). *Hoehnea* **11**, 47-58.
- Clarke P, Lawes M, Midgley J, Lamont B, Ojeda F, Burrows G, Enright N, Knox K (2013) Resprouting as a key functional trait: how buds, protection and resources drive persistence after fire. *New Phytologist* **197**, 19-35. [doi:10.1111/nph.12001](https://doi.org/10.1111/nph.12001)

- Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Diaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, Ter Steege H, Morgan HD, Van Der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H (2003) A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **51**, 335-380. [doi:10.1071/BT02124](https://doi.org/10.1071/BT02124)
- Cox G, Hawes CR, Van der Lubbe L, Juniper BE (1987) High-Voltage Electron Microscopy of Whole, Critical-Point Dried Plant Cells. 2. Cytoskeletal Structures and Plastid Motility in *Selaginella*. *Protoplasma* **140**, 173-186. [doi:10.1007/BF01273727](https://doi.org/10.1007/BF01273727)
- Dantas VL, Batalha MA (2011) Vegetation structure: fine scale relationships with soil in a cerrado site. *Flora* **206**, 341–346. [doi:10.1016/j.flora.2010.11.003](https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.11.003)
- David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidique et ter-péniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris* **258**, 1338-1340.
- De Cáceres M, Font X, García R, Oliva F (2003). 'VEGANA, un paquete de programas para la gestión y análisis de datos ecológicos'. (VII Congreso Nacional de la Asociación Española de Ecología Terrestre, Bellaterra, España). Available at <http://biodiver.bio.ub.es/vegana/papers/AEET2003def.pdf> [Verified 2 May 2013]
- Díaz S, Cabido M (1997) Plant functional types and ecosystem function in relation to global change. *Journal of Vegetation Science* **8**, 463-474. [doi:10.1111/j.1654-1103.1997.tb00842.x](https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.1997.tb00842.x)
- Diaz S, Hodgson J, Thompson K, Cabido M, Cornelissen J, Jalili A, Montserrat-Marti G, Grime J, Zarrinkamar F, Asri Y, Band S, Basconcelo S, Castro-Diez P, Funes G, Hamzehee B, Khoshnevi M, Perez-Harguindeguy N, Perez-Rontome M, Shirvany F, Vendramini F, Yazdani S, Abbas-Azimi R, Bogaard A, Boustani S, Charles M, Dehghan M, de Torres-Espuny L, Falczuk V, Guerrero-Campo J, Hynd A, Jones G, Kowsary E, Kazemi-Saeed F, Maestro-Martinez M, Romo-Diez A, Shaw S, Siavash B, Villar-Salvador P, Za M (2004) The plant traits that drive ecosystems: evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* **15**, 295-304. [doi:10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x](https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x)
- Echternacht L, Trovó M, Oliveira CT, Pirani JR (2011) Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. *Flora* **206**, 782-791. [doi:10.1016/j.flora.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.04.003)
- Falster DS, Westoby M (2003) Leaf size and angle vary widely across species: what

consequences for light interception? *New Phytologist* **158**, 509-525.

Fahn A, Cutler DF (1992) 'Xerophytes. Encyclopedia of Plant Anatomy'. (Borntraeger: Berlin-Stuttgart)

Falster DS, Westoby M (2003) Leaf size and angle vary widely across species: what consequences for light interception? *New Phytologist* **158**, 509–525. [doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00765.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00765.x)

Fiaschi P, Pirani JR (2009) Review of plant biogeographic studies in Brazil. *Journal of Systematics and Evolution* **47**, 477-496. [doi:10.1111/j.1759-6831.2009.00046.x](https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2009.00046.x)

Franceschi VR, Nakata PA (2005) Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biology* **56**, 41-71. [doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144106)

Fujinami R, Yoshihama I, Imaichi R (2011) Dimorphic chloroplasts in the epidermis of Podostemoideae, a subfamily of the unique aquatic angiosperm family Podostemaceae. *Journal of Plant Research* **124**, 601-605. [doi:10.1007/s10265-010-0392-8](https://doi.org/10.1007/s10265-010-0392-8)

Fundação Biodiversitas (2005) 'Lista da flora brasileira ameaçada de extinção'. (Workshop "Revisão da Lista da flora brasileira ameaçada de extinção"). Available at: http://www.biodiversitas.org.br/cepf/edital/flora_brasil.pdf [Verified 1 September 2013]

Giulietti AM, Pirani JR, Harley RM (1997) Espinhaço range region. In: 'Centres of Plant Diversity: a guide and strategy for their conservation. Vol. 3: The Americas'. (Eds SD Davis, VH Heywood, O Herrera-MacBride, J Villa-Lobos, AC Hamilton) pp. 397-404. (WWF-IUCN: Cambridge, United Kingdom)

Givnish TJ, McDiarmid RW, Buck WR (1986) Fire adaptation in *Neblinaria celiae* (Theaceae), a high-elevation rosette shrub endemic to a wet equatorial tepui. *Oecologia* **70**, 481-485. [doi:10.1007/BF00379892](https://doi.org/10.1007/BF00379892)

Gontijo BM (2008) Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**, 7-14. Available at http://www.conservation.org.br/publicacoes/files_mega4/01_uma_geografia_para_a_cadeia_do_espinhaco.pdf. [Verified 24 April 2014]

Goodland R, Ferri MG (1979) 'Ecologia do Cerrado.' (Universidade de São Paulo: São Paulo)

Hassiotou F, Ludwig M, Renton M, Veneklaas E, Evans J (2009) Influence of leaf dry mass per area, CO₂, and irradiance on mesophyll conductance in sclerophylls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2303-2314. [doi:10.1093/jxb/erp021](https://doi.org/10.1093/jxb/erp021)

- Hough RA, Wetzel RG (1977) Photosynthetic pathways of some aquatic plants. *Aquatic Botany* **3**, 297-313. doi:10.1016/0304-3770(77)90035-3
- INMET (2013) 'Dados meteorológicos' (Instituto Nacional de Meteorologia). Available at <http://www.inmet.gov.br/portal/> [Verified 01 April 2013]
- James SA, Bell DT (2000) Leaf orientation, light interception and stomatal conductance of *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* leaves. *Tree Physiology* **20**, 815-823. doi:10.1093/treephys/20.12.815
- Johansen DA (1940) 'Plant Microtechnique'. (McGraw-Hill: New York)
- Jordan GJ, Dillon RA, Weston PH (2005) Solar radiation as a factor in the evolution of scleromorphic leaf anatomy in Proteaceae. *American Journal of Botany* **92**, 789-796. doi:10.3732/ajb.92.5.789
- Jordan G, Weston P, Carpenter R, Dillon R, Brodribb T (2008) The evolutionary relations of sunken covered, and encrypted stomata to dry habitats in Proteaceae. *American Journal of Botany* **95**, 521-530. doi:10.3732/ajb.2007333
- Jordan GJ, Carpenter RJ, Brodribb TJ (2014) Using fossil leaves as evidence for open vegetation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **395**, 168-175. doi:10.1016/j.palaeo.2013.12.035
- Karabourniotis G (1998) Light-guiding function of foliar sclereids in the evergreen sclerophyll *Phillyrea latifolia*: a quantitative approach. *Journal of Experimental Botany* **49**, 739-746. doi:10.1093/jxb/49.321.739
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of cell Biology* **27**, 137A-138A.
- Kofidis G, Bosabalidis A, Moustakas M (2003) Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in Oregano (*Origanum vulgare* L.). *Annals of Botany* **92**, 635-645. doi:10.1093/aob/mcg180
- Loeuille B (2011) Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae). Thesis. University of São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Lusa MG, Boeger MR, Moço MCC, Bona C (2011) Morpho-anatomical adaptations of *Potamogeton polygonus* (Potamogetonaceae) to lotic and lentic environments. *Rodriguesia* **62**, 927-936. Available at <http://rodriguesia.jbrj.gov.br/FASCICULOS/rodrig62-4/17%20->

%20ID337.pdf.[Verified 1 September 2013]

- Mansanares ME, Forni-Martins ER, Semir J (2002) Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart.(Lychnophorinae, Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* **55**, 367–374. doi:10.1080/00087114.2002.10797889
- Mansanares ME, Forni-Martins ER, Semir J (2007) Cytotaxonomy of *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae) species. *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics* **60**, 21–28. doi:10.1080/00087114.2007.10589543
- Marques AR, Garcia QS, Rezende JLP, Fernandes GW (2000) Variations in leaf characteristics of two species of *Miconia* in the Brazilian cerrado under different light intensities. *Tropical Ecology* **41**, 47-60.
- Mello-Silva R (1990) Morphological and anatomical differentiation of *Vellozia hirsuta* populations (Velloziaceae). *Plant Systematics and Evolution* **173**, 197-208. doi:10.1007/BF00940863
- Nakajima JN, Teles AM, Ritter M, Mondin CA, Dematteis M, Heiden G, Borges XB, Rivera VL, Bringer Jr JBA, Saavedra M, de Cássia Araújo Pereira R, Sales-de-Melo MRC (2009) Asteraceae. In 'Plantas raras do Brasil: Conservação Internacional'. (Ed AM Giulietti) pp. 76-89. (Universidade Estadual de Feira de Santana: Belo Horizonte, Brasil)
- Navarro T, Alados CL, Cabezudo B (2006) Changes in plant functional types in response to goat and sheep grazing in two semi-arid shrublands of SE Spain. *Journal of Arid Environments* **64**, 298-322. doi:10.1016/j.jaridenv.2005.05.005
- Noble I, Gitay H (1996) A functional classification for predicting the dynamics of landscapes. *Journal of Vegetation Science* **7**, 329-336. doi:10.2307/3236276
- Oliveira V, Sajo M (1999) Root anatomy of nine Orchidaceae species. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **42**, 405-413. doi:10.1590/S1516-89131999000400005
- Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA (2007) Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences* **11**, 1633-1644. doi:10.5194/hess-11-1633-2007
- Perez-Harguindeguy N, Diaz S, Garnier E, Lavorel S, Poorter H, Jaureguiberry P, Bret-Harte M, Cornwell W, Craine J, Gurvich D, Urcelay C, Veneklaas E, Reich P, Poorter L, Wright I,

- Ray P, Enrico L, Pausas J, de Vos A, Buchmann N, Funes G, Quetier F, Hodgson J, Thompson K, Morgan H, ter Steege H, van der Heijden M, Sack L, Blonder B, Poschlod P, Vaieretti M, Conti G, Staver A, Aquino S, Cornelissen J (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **61**, 167-234. doi:10.1071/BT12225
- Podani J (2007) 'Análisi ed esplorazione multivariata dei dati in ecologia e biologia'. (Liguori Editore: Napoli)
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**, 15-23. Available at http://www.inot.org.br/artigo/Rapini_et_al_2008_A_flora_dos_campos_rupestres_da_Cadeia_do_Espinhaco.pdf [Verified 1 April 2014].
- Ribeiro JF, Walter BM (2008) As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In 'Cerrado. Vol. 1: Ecologia e Flora'. (Eds SM Sano, SP Almeida, JF Ribeiro) pp. 151-212. (Embrapa Cerrados: Brasília, Brasil)
- Rizzini CT (1997) 'Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos.' (Âmbito Cultural Edições: Rio de Janeiro, Brasil)
- Rotondi A, Rossi F, Asunis C, Cesaraccio, C (2003) Leaf xeromorphic adaptations of some plants of coastal Mediterranean macchia ecosystem. *Journal of Mediterranean Ecology* **4**, 25-35.
- Sajo MG, Wanderley MGL, Carvalho LM (1995) Caracterização anatômica foliar para 14 espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) da Serra do Cipó, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **9**, 101-114. doi:10.1590/S0102-33061995000100004
- Sakai WS (1973) Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* **48**, 247-249.
- Sakurai N, Domoto K, Takagi S (2005) Blue-light-induced reorganization of the actin cytoskeleton and the avoidance response of chloroplasts in epidermal cells of *Vallisneria gigantea*. *Planta* **221**, 66-74. doi:10.1007/s00425-004-1416-1
- Scatena V, Giulietti A, Borba E, van den Berg C (2005) Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. *Plant Systematics and Evolution* **253**, 1-22. doi:10.1007/s00606-004-0295-z

- Semir J, Rezende AR, Monge M, Lopes NP (2011) 'As arnicas endêmicas das serras do Brasil: uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae).' (Editora UFOP: Ouro Preto, MG, Brasil)
- Sharkey TD, Chen X, Yeh S (2001) Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology* **125**, 2001-2006. [doi:10.1104/pp.125.4.2001](https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2001)
- Singsaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD (1997) Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiology* **115**, 1413-1420.
- Smith A, Young T (1987) Tropical alpine plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 137-158. [doi:10.1146/annurev.es.18.110187.001033](https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001033)
- Stern W, Judd W, Carlsward B (2004) Systematic and comparative anatomy of Maxillarieae (Orchidaceae), sans Onciinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **144**, 251-274. [doi:10.1111/j.1095-8339.2003.00257.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2003.00257.x)
- Takagi S (2003) Actin-based photo-orientation movement of chloroplasts in plant cells. *Journal of Experimental Biology* **206**, 1963-69. [doi:10.1242/jeb.00215](https://doi.org/10.1242/jeb.00215)
- Turner IM (1994) Sclerophylly - primarily protective? *Functional Ecology* **8**, 669-675. [doi:10.2307/2390225](https://doi.org/10.2307/2390225)
- Versieux L, Elbl P, Wanderley M, Menezes N (2010) *Alcantarea* (Bromeliaceae) leaf anatomical characterization and its systematic implications. *Nordic Journal of Botany* **28**, 385-397. [doi:10.1111/j.1756-1051.2010.00727.x](https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2010.00727.x)
- Vogelmann TC, Martin G (1993) The function significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. *Plant, cell & environment* **16**, 65-72. [doi:10.1111/j.1365-3040.1993.tb00845.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00845.x)
- Walker BH (1992) Biodiversity and Ecological Redundancy. *Conservation Biology* **6**, 18-23. [doi:10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x](https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x)

APPENDIX

Appendix 1. Details on how stem nodes have been evaluated in each

Lychnophorinae species

Lychnophorinae species	Stem nodes evaluated
<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H.Rob.	1–20°
<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	1–15°
<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.	1–10°
<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	1–30°
<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J.N.Nakaj. & Semir.	1–15°
<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	1–10°
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B.Jones	1–50°
<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H.Rob.	1–50°
<i>Minasia scapigera</i> H.Rob.	A
<i>Paralychnophora bicolor</i> (DC.) MacLeish	1–20°
<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille	1–30°
<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	A

^ASpecies with rosette habit. All the internodes have been analysed.

Appendix 2. Matrix of qualitative data used in principal coordinates analysis

For species code see Table 1. For variable numbers see Table 2

Species code	Variable																														
	1	2	3	4	5a	5b	5c	6	7a	7b	7c	8a	8b	9	10a	10b	11	12a	12b	13a	13b	14a	14b	15a	15b	16a	16b	17a	17b	18	
Anthat	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Blahet	2	1	0	0	2	1	1	0	1	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Chrbif	1	1	1	0	2	2	2	1	1	2	1	1	1	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Erepol	3	1	0	0	2	1	1	2	1	2	2	0	0	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Hetgra	2	1	0	0	2	4	2	2	1	2	2	1	0	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Lycdia	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	0	0	1	1	3	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Lyctom	1	2	2	1	2	2	2	2	1	3	1	0	0	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lyctri	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	1	0	0	0	0	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Minsca	1	1	2	0	1	3	0	3	0	1	0	0	0	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
Parbic	1	1	0	1	2	2	2	2	1	3	1	0	0	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Pipmon	1	1	1	0	2	3	2	1	1	2	2	1	1	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Preeri	1	2	2	1	2	2	0	3	1	2	0	0	0	0	1	3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

Appendix 3. Matrix of quantitative data used in principal coordinates analysis

For species code see Table 1. For variable abbreviations see Table 2

Species code	Variable				
	CT	OW	ET	LT	IT
Anthat	5.15	2.03	20.85	2187.99	173.10
Blahet	1.75	2.55	22.28	922.45	115.81
Chrbif	2.83	1.35	25.37	3153.68	125.59
Erepol	3.76	2.19	34.71	725.55	217.86
Hetgra	0.00	1.60	18.19	2019.25	133.08
Lyctom	7.93	5.42	56.97	2629.06	1309.34
Lycdia	9.52	3.86	78.38	1057.18	241.55
Lyctri	5.36	5.32	94.47	509.90	249.20
Minsca	0.00	1.73	26.78	776.38	343.17
Parbic	16.34	1.54	36.70	2133.89	399.81
Pipmon	2.69	2.14	31.62	486.90	130.15
Preeri	7.65	3.48	67.68	1346.44	240.00

CAPÍTULO 5

Morfoanatomia das Lychnophorinae numa perspectiva filogenética

Morfoanatomia das Lychnophorinae numa perspectiva filogenética

RESUMO

A subtribo Lychnophorinae é monofilética, compreende 18 gêneros e 104 espécies e é quase exclusivamente restrita ao Brasil. As espécies ocupam áreas do Domínio Cerrado, principalmente nos campos rupestres e cerrados do Planalto Central, sendo a Cadeia do Espinhaço a área de maior riqueza. Menos frequentemente, alguns táxons ocorrem em outras fitofisionomias. As Lychnophorinae apresentam uma grande variedade de hábitos incluindo arbustos, subarbustos, arvoretas, árvores e raramente, ervas, além do hábito caulirosula. Os ambientes do Domínio Cerrado são frequentemente sujeitos à ocorrência de fogo durante a estação seca e solos ácidos e bem drenados. As condições ecológicas peculiares dos campos rupestres e cerrados provavelmente estão relacionadas ao endemismo e ao isolamento encontrado entre as espécies deste ambiente. Levando-se em conta a morfoanatomia foliar e caulinar foram investigados nesse estudo caracteres com possível valor informativo para a taxonomia de Lychnophorinae e foi realizado um mapeamento dos caracteres mais informativos na filogenia previamente estabelecida de Lychnophorinae. Procurou-se identificar possíveis sinapomorfias e os padrões evolutivos evidenciados especialmente pelas características que determinaram o sucesso dessas espécies na ocupação dos atuais habitats. Amostras de folhas e caules de 51 espécies foram analisadas utilizando técnicas usuais em anatomia vegetal. A reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foi efetuada em parcimônia utilizando a filogenia previamente estabelecida. Os caules das espécies de Lychnophorinae podem ser classificados em dois

tipos distintos: tipo 1, presente em espécies com hábito caulirosula; e tipo 2, que compreende os caules dos demais hábitos. As folhas apresentam características muito variadas entre si. As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres indicaram a ocorrência de oito possíveis sinapomorfias para as folhas: lâmina foliar ondulada, arranjo múltiplo dos feixes vasculares na nervura central, epiderme esporadicamente bisseriada, contorno na nervura central suavemente elevado em ambas as superfícies; mesofilo isofacial, parênquima incolor na região do mesofilo, parênquima clorofiliano restrito aos setores adjacentes aos estômatos e a presença de extensões de bainha do feixe. Além disso, as reconstruções indicaram a ocorrência de provável convergência adaptativa nos táxons com hábito caulirosula e também para diversos caracteres foliares como: margem foliar revoluta, criptas, cutícula espessa na face adaxial, estômatos e indumento conspicuo em ambas as faces da folha, presença de mesofilo espessado e hipoderme. Os resultados indicam que a evolução da diversidade morfológica e anatômica em Lychnophorinae parece ter sido direcionada por pressões adaptativas derivadas de fatores ecofisiológicos dos ambientes restritos em que habitam a maioria das espécies, principalmente as linhagens mais “derivadas”.

Palavras-chave: Lychnophorinae, Domínio Cerrado, Brazil, diversidade morfoanatômica, hábito caulirosula, sinapomorfias foliares, convergências adaptativas.

INTRODUÇÃO

Para a família Asteraceae atualmente são reconhecidas 12 subfamílias e 43 tribos (Funk *et al.* 2009). A tribo Vernonieae, uma das maiores da família, apresenta relações não resolvidas entre as subtribos e problemas quanto as circunscrições de muitos gêneros (Keeley *et al.*, 2007; Keeley e Robinson, 2009). Entre as 21 subtribos pertencentes a Vernonieae, Lychnophorinae compreende 18 gêneros e 104 espécies, sendo quase exclusivamente restrita ao Brasil com apenas uma espécie boliviana (Loeuille, 2011).

As espécies ocupam áreas do Domínio Cerrado, principalmente nos *campos rupestres* e cerrados do Planalto Central, sendo a Cadeia do Espinhaço sobre os Estados de Minas Gerais e Bahia, a área de maior riqueza. Menos frequentemente, alguns táxons ocorrem em outras fitofisionomias: *Blanchetia* é encontrado na Caatinga e na Floresta Atlântica, *Gorceixia* em florestas decíduas e semidecíduas, *Hololepis* e espécies de *Eremanthus* podem ocupar as bordas de matas ciliares e ainda, algumas espécies de *Eremanthus* podem habitar restingas costeiras (Loeuille, 2011). Recentemente, resultados da filogenia de Lychnophorinae, utilizando dados morfológicos e moleculares (Loeuille, 2011), indicaram que a subtribo é monofilética quando inclui as subtribos Centratherinae e Sipolesiinae e os gêneros monoespecíficos *Blanchetia* e *Gorceixia*. No entanto, ainda existem algumas dúvidas no posicionamento filogenético de alguns táxons da subtribo. Por tal motivo as espécies da subtribo continuam sendo investigadas, visando gerar novos dados que auxiliem no entendimento evolutivo do grupo.

Os ambientes do Domínio Cerrado, onde está inserida a maioria das espécies de Lychnophorinae, são caracterizados por apresentarem uma estação seca, com ocorrência de fogo e solos geralmente ácidos, pobres em nutrientes e bem drenados, que podem influenciar na disponibilidade de água para as plantas que habitam esses solos (Goodland e Ferri, 1979; Ratter *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2009; Dantas e Batalha, 2011). As espécies de Lychnophorinae que habitam os *campos rupestres* apresentam diversas características morfológicas e anatômicas peculiares, como a presença de folhas sobrepostas, de esclereídes e criptas nas folhas, entre outras, que refletem possíveis adaptações estruturais ao ambiente (Lusa *et al.*, 2014). As condições ecológicas peculiares dos *campos rupestres* e cerrados da Cadeia do Espinhaço provavelmente promoveram intensa especiação e essa pode ser uma das razões para o endemismo e isolamento encontrado entre as espécies deste ambiente (Giulietti *et al.* 1997; Rapini *et al.* 2008; Echternacht *et al.* 2011). A Cadeia do Espinhaço é caracterizada por um grande número de espécies micro- e macroendêmicas, entre elas, 15 espécies de Lychnophorinae são consideradas raras (Nakajima *et al.* 2009) e 46 espécies são ameaçadas de extinção (Nakajima *et al.*, 2013).

Estudos recentes abordando investigações morfoanatômicas aliadas a estudos filogenéticos (Pace *et al.* 2011; Pace e Angyalossy, 2013; Nogueira *et al.*; 2013) têm contribuído para o entendimento da evolução dos grupos de plantas investigados. Levando-se em conta a morfoanatomia foliar e caulinar foram investigados nesse estudo caracteres com possível valor informativo para a taxonomia de Lychnophorinae. Além disso, realizou-se um mapeamento dos caracteres morfológicos e anatômicos mais informativos na filogenia previamente estabelecida de Lychnophorinae (Loeuille, 2011) e procurou-se responder as seguintes questões: os caracteres morfoanatômicos podem distinguir os

principais táxons da filogenia? Quais são os padrões evolutivos evidenciados para esses caracteres? Quais estados de caráter podem ser interpretados como possíveis sinapomorfias? Qual a influencia do hábito sobre essas características? E quais características morfológicas e anatômicas podem ter influenciado no sucesso dessas espécies na ocupação dos atuais habitats?

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Nesse estudo foram avaliadas 51 espécies. Para o estudo completo da anatomia das folhas e dos ramos e eixos caulinares aéreos de Lychnophorinae, foram analisadas 13 espécies representantes dos principais clados da subtribo (Apêndice 1). As análises foliares contemplaram primórdios foliares, folhas jovens e expandidas, sendo essas na região da bainha e, ou pecíolo e do terço médio da lâmina. Para os caules, foram analisados ramos caulinares, do ápice às regiões espessadas correspondentes à porção lenhosa dos ramos (no caso de subarbustos, arbustos, arvoretas e árvores); ou foram analisados os eixos caulinares em toda a sua extensão (em plantas com hábito caulirosula). Foram avaliados três indivíduos para cada espécie, sendo um sistema caulinar e três folhas para cada indivíduo. Exsicatas foram depositadas no herbário SPF (Apêndice 1).

Após as análises e a identificação das principais características anatômicas dos gêneros e táxons de Lychnophorinae, foram amostradas 36 espécies herborizadas da subtribo Lychnophorinae. Essas espécies foram eleitas por pertencerem às mesmas

linhagens das espécies previamente escolhidas - ou, em alguns casos, a linhagens ainda não compreendidas na primeira amostragem - com o objetivo de verificar as características morfológicas e anatômicas mais informativas para os táxons e mapear esses caracteres na filogenia da subtribo. Além das espécies de Lychnophorinae, foram eleitas duas espécies da tribo Vernonieae (*Chresta pacourinoides* e *Piptocarpha oblonga*) como grupos externos, os mesmos usados na filogenia de Lychnophorinae (Loeuile, 2011). As amostras foram obtidas conforme o protocolo anteriormente citado, enfocando as regiões de maior interesse para a identificação dos caracteres diagnósticos, tais como terço médio da lâmina foliar, bainha e, ou pecíolo e regiões apicais e subapicais dos ramos e dos eixos caulinares. Uma lista com as espécies herborizadas analisadas está disponível no Apêndice 2.

Caracterização micromorfológica

Para o estudo estrutural dos órgãos vegetativos aéreos das 13 espécies de Lychnophorinae (Apêndice 1) as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965, modificada com a utilização de tampão fosfato pH 7,2), submetidas à bomba de vácuo para retirada do ar contido nos tecidos, desidratadas em série etílica e infiltradas em resina plástica hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin®, Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany), segundo as instruções do fabricante. As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo manual (Modelo RM 2245, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) com navalha de aço, na espessura de 5-7 µm. Lâminas histológicas foram coradas com azul de toluidina 0,05% (em tampão citrato-fosfato, pH 4,5) (Sakai 1973) e montadas em resina sintética Entellan® (Merck®, Darmstadt, Germany). Além disso, foram realizadas as seguintes reações histoquímicas: Calcofluor White M2R sob

fluorescência (Hughes e McCully, 1975) para celulose; Sudan IV (Jensen, 1962) para substâncias lipofílicas; e vermelho de rutênio (Gregory & Baas, 1989) para substâncias pécticas. As secções foram examinadas imediatamente após cada reação. Para o teste com Calcofluor White, as secções foram observadas ao microscópio (Modelo DM LB, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) equipado com "HBO 100W mercury vapour lamp", utilizando-se um filtro de excitação violeta (bandpass filter 355-425). A documentação dos resultados foi realizada através da captura de imagens a partir das lâminas, usando câmera de vídeo (Modelo DC 300F Leica Microsystems (Schweiz) AG, Heerbrugg, Switzerland) acoplada ao Microscópio anteriormente citado.

Para as análises estruturais realizadas a partir do material herborizado, as amostras foram reidratadas em solução de álcool, água e glicerina na proporção 1:1:1 (modificado de Alcorn & Ark, 1953) e seccionadas em micrótomo de deslize (Modelo SM 2000R Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) ou à mão livre, com auxílio de lâmina de barbear. Foram montadas lâminas semipermanentes com o material histológico e gelatina glicerinada, as quais foram observadas em microscópio (Modelo CME 1349521X, Leica Microsystems, Buffalo, U.S.A.).

Codificação dos caracteres e mapeamento na filogenia

A árvore filogenética utilizada nesse estudo é a árvore de consenso estrito de 44 árvores igualmente parcimoniosas resultante da análise combinada dados moleculares (ITS, ETS, *ndhF* e *rpl32-trnL*) e morfológicos realizada por Loeuille (2011). No entanto, foram utilizadas como terminais na árvore, exclusivamente as espécies analisadas em relação à

morfologia e à anatomia, totalizando 52 terminais (Figura 1). Ao todos foram abordados 16 gêneros (ou linhagens) dos 18 atualmente reconhecidos para Lychnophorinae (Loeuille, 2011). Para os demais gêneros (*Albertinia* e *Vinicia*) o material herborizado era insuficiente e de difícil acesso nos locais de ocorrência das espécies. De acordo com a hipótese filogenética utilizada nesse estudo, os gêneros na sua maioria são monofiléticos, com exceção de *Eremanthus* e *Lychnophora*. *Eremanthus* apresenta algumas espécies externas ao clado *Eremanthus* sensu stricto (s. str.): uma linhagem mais “basal” independente (*E. crotonoides*), um terminal no clado ‘Bahian *Lychnophora*’ (*E. leucodendron*), e outro no clado *Piptolepis* (*E. pabstii*). O gênero *Lychnophora* apresenta terminais externos ao clado *Lychnophora* s. str. nas linhagens: Aliança *Prestelia* (clado *L. jolyana* + *L. sellowii* + *L. tomentosa*), ‘Bahian *Lychnophora*’ (*L. santosii* e clado *L. regis* + *L. triflora*) e *Eremanthus* s. str. (*L. syncephala*). Dessa maneira, os táxons são representados por 14 linhagens independentes ilustradas na Figura 1. Para a reconstrução dos estados ancestrais dos caracteres foram combinadas as informações morfológicas e anatômicas com a hipótese filogenética de Lychnophorinae através de reconstruções em parcimônia. Além disso, para os nós onde havia ambiguidade, foram geradas todas as 'reconstruções mais parcimoniosas' ('most parsimonious reconstructions' - MPRs). Essas análises foram implementadas no programa Mesquite 2.74 (Maddison e Maddison, 2007).

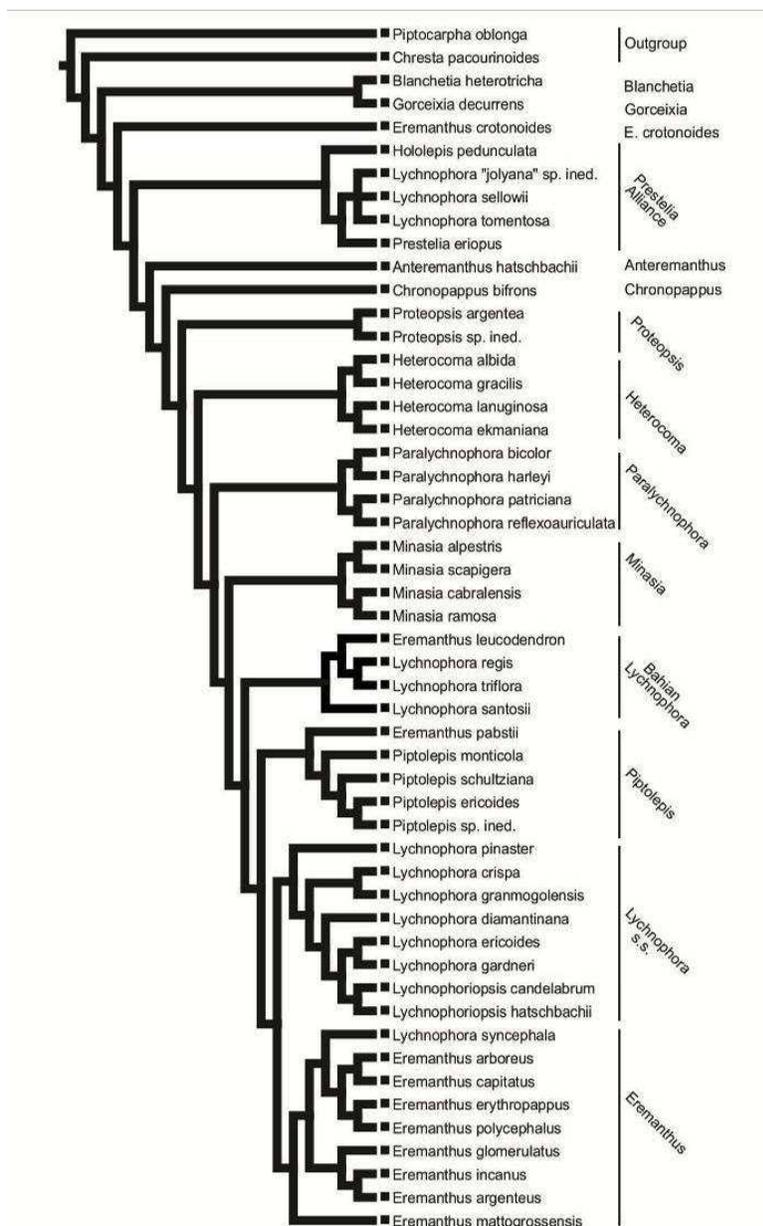


Figura 1. Relações filogenéticas das espécies de Lychnophorinae resultante da análise em parcimônia de dados moleculares (ITS, ETS, *ndhF* e *rpl32-trnL*) e dados macromorfológicos (Loeuille *et al.*, in prep.) para as espécies abordadas nesse estudo (52 terminais). São nomeadas também as linhagens principais. Os táxons *Blanchetia*, *Gorceixia* e *Chronopappus* são gêneros monoespecíficos e são representados apenas com o nome genérico. *Antheremanthus* possui mais uma espécie descrita recentemente, sendo indicado o nome abreviado da espécie *Antheremanthus hatschbachii*, já que a nova espécie não foi investigada.

RESULTADOS

Morfologia e anatomia dos caules e folhas

Caules

Os caules das espécies de Lychnophorinae podem ser classificados em dois tipos distintos, de acordo com as características morfológicas e anatômicas, as quais estão estreitamente relacionadas com o hábito das espécies. Tipo 1, nas espécies com hábito caulirosula (Fig. 2A-E) e tipo 2, nas espécies que apresentam os demais hábitos (Fig. 2F-G) (subarbustivo, arbustivo, arbóreo ou arvoretas). Os grupos taxonômicos referidos na descrição dos caules estão ilustrados na Figura 1.

Tipo 1 - Presente em espécies com hábito caulirosula, ou seja, que apresentam rosetas terminais localizadas sobre caules eretos (Fig. 2A-C). Em Lychnophorinae esse hábito é verificado nos gêneros *Minasia*, *Prestelia* e *Proteopsis*. Os caules nesses grupos apresentam sistema caulinar monopodial predominantemente não ramificado (podendo ocorrer ramificações esporadicamente) e são revestidos por folhas. As folhas que constituem a roseta têm longa durabilidade, e após a sua senescência, muitas permanecem aderidas ao caule, constituindo folhas marcescentes (Fig. 2A-C). Quando finalmente as lâminas são degradadas, partes da folha (como a bainha e o pecíolo) ficam aderidas permanentemente formando uma cobertura caulinar conspícua e isolante no caule, que o faz parecer muito mais espesso do que é na realidade (Fig. 2D-E). Os caules das espécies caulirosuladas variam com relação à altura (de 8cm a cerca de 60cm), principalmente em função do gênero (Fig. 2A-C).

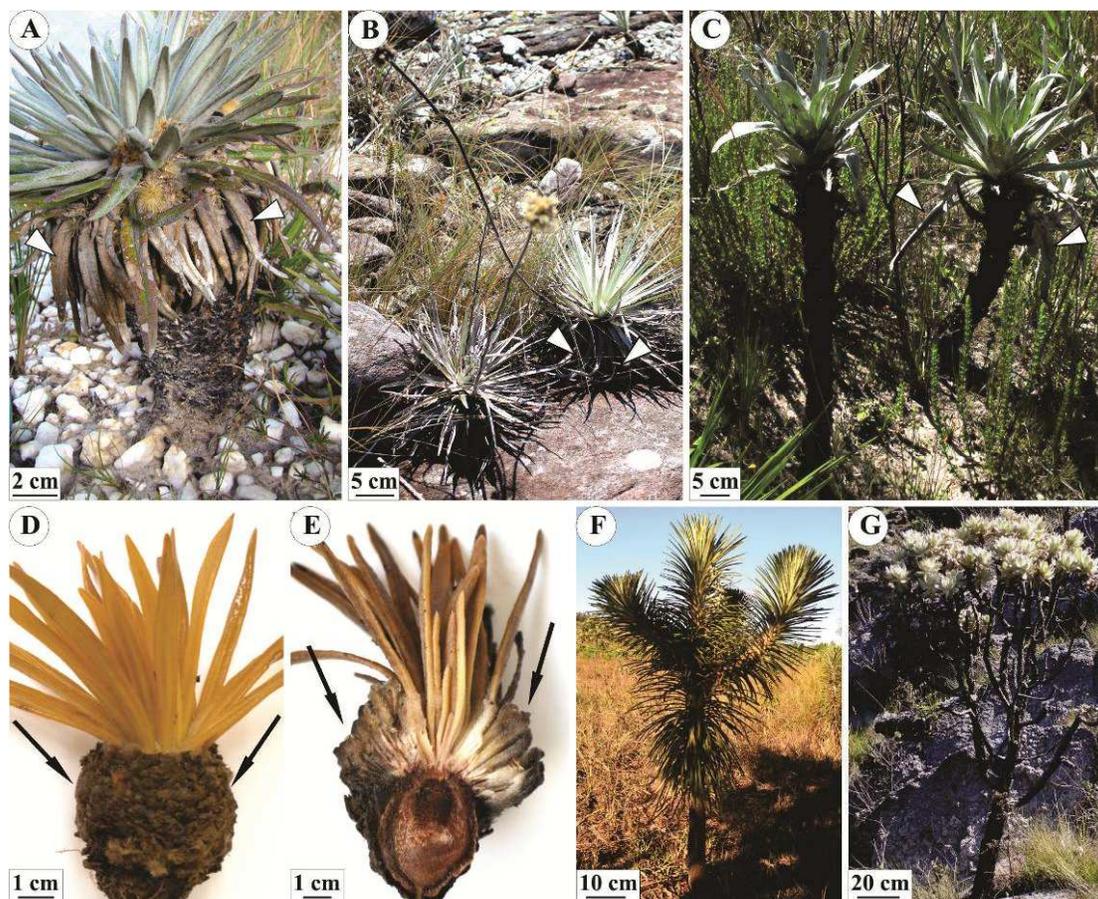


Fig. 2. Caracterização do hábito. A-E. Hábito caulirosula. F-G. Arvoretas. A, D-E. *Prestelia eriopus*. B. *Minasia scapigera*. C. *Proteopsis argentea*. F. *Lychnophora* sp. G. *Eremanthus leucodendron*. A-C. Espécies apresentando caules eretos com crescimento monopodial e com rosetas terminais, evidenciando folhas marcescentes (cabeça de seta branca). D-E. Detalhe de indivíduo demonstrando o caule congestionado com cobertura (setas pretas) formada por partes remanescentes das folhas (bainhas e pecíolos); D. Vista frontal; E. Secção longitudinal. F-G. Arvoretas com sistema principal de crescimento monopodial no tronco.

Nos indivíduos adultos de espécies caulirosuladas, o meristema apical caulinar (Fig. 3A-C) origina na parte superior a protoderme, enquanto que a zona de células-mãe centrais origina basalmente o meristema medular, e as células laterais dessa zona originam o meristema periférico (Fig. 3B). As células originadas no meristema medular continuam se

dividindo anticlinalmente (Fig. 3B-C), originando faixas de células arqueadas em direção ao procâmbio e ampliando a medula. O meristema periférico gera o procâmbio e o meristema fundamental - externa e internamente ao procâmbio (Fig. 3B-C). O procâmbio se posiciona paralelamente em relação ao ápice caulinar em função da atividade do meristema fundamental interno e do pronunciado aumento da região medular (Fig. 3A-3C). Externamente ao procâmbio, o meristema fundamental possui atividade pronunciada originando faixas de células arqueadas para a periferia do órgão (Fig. 3A-3C). Internamente o meristema fundamental contribui para a ampliação da medula, através da formação de faixas de células medulares também arqueadas em direção àquelas geradas pelo meristema medular (Fig. 3C). Dessa maneira, os meristemas medular e periférico contribuem para o máximo espessamento da porção terminal do caule (Fig. 3A).

Os primórdios foliares se originam sucessivamente de tal maneira que geram folhas acentuadamente imbricadas e entrenós muito curtos (Fig. 3A), formando as rosetas terminais. Isso faz com que a epiderme caulinar seja extremamente reduzida às pequenas extensões entre as folhas jovens e as expandidas (Fig. 3A).

No caule maduro, a projeção lateral resultante do padrão de espessamento cortical e medular eleva os primórdios e as folhas jovens em relação ao ápice caulinar, o qual fica posicionado numa depressão (Fig. 3A e 3D). A atividade pronunciada dos meristemas periférico e medular faz com que o diâmetro da região próxima ao ápice seja similar ao diâmetro das porções do caule nas quais o câmbio já está em atividade (Fig. 3D). O revestimento secundário do caule é formado pela suberização das partes foliares que permanecem aderidas ao caule e de camadas mais externas do floema secundário (Fig. 3A e 3D). Esclereídes, geralmente organizadas em grupos, estão presentes apenas no córtex, nas

porções mais apicais do caule (Fig. 3D). Nas regiões de crescimento secundário ocorrem esclereídes no córtex, floema secundário e na medula (Fig. 3D).

Nos indivíduos jovens das espécies caulirosuladas o ápice caulinar não se localiza numa depressão visto que a atividade dos meristemas periférico e medular é menos pronunciada (Fig. 3E) do que nos ápices dos indivíduos adultos (Fig. 3A). Embora os primórdios sejam formados muito próximos entre si, ocorre o alongamento dos entrenós (Fig. 3E) diferentemente do que se observa nos ápices dos indivíduos adultos (Fig. 3A). A epiderme caulinar entre as folhas jovens e expandidas apresenta tricomas glandulares e não glandulares (Fig. 3E) não verificados nos caules maduros. Nas porções apicais caulinares dos indivíduos jovens a largura do córtex é proporcionalmente menor que da medula e, em geral, não são observadas esclereídes quando comparadas aos indivíduos adultos (Fig. 3D-E).

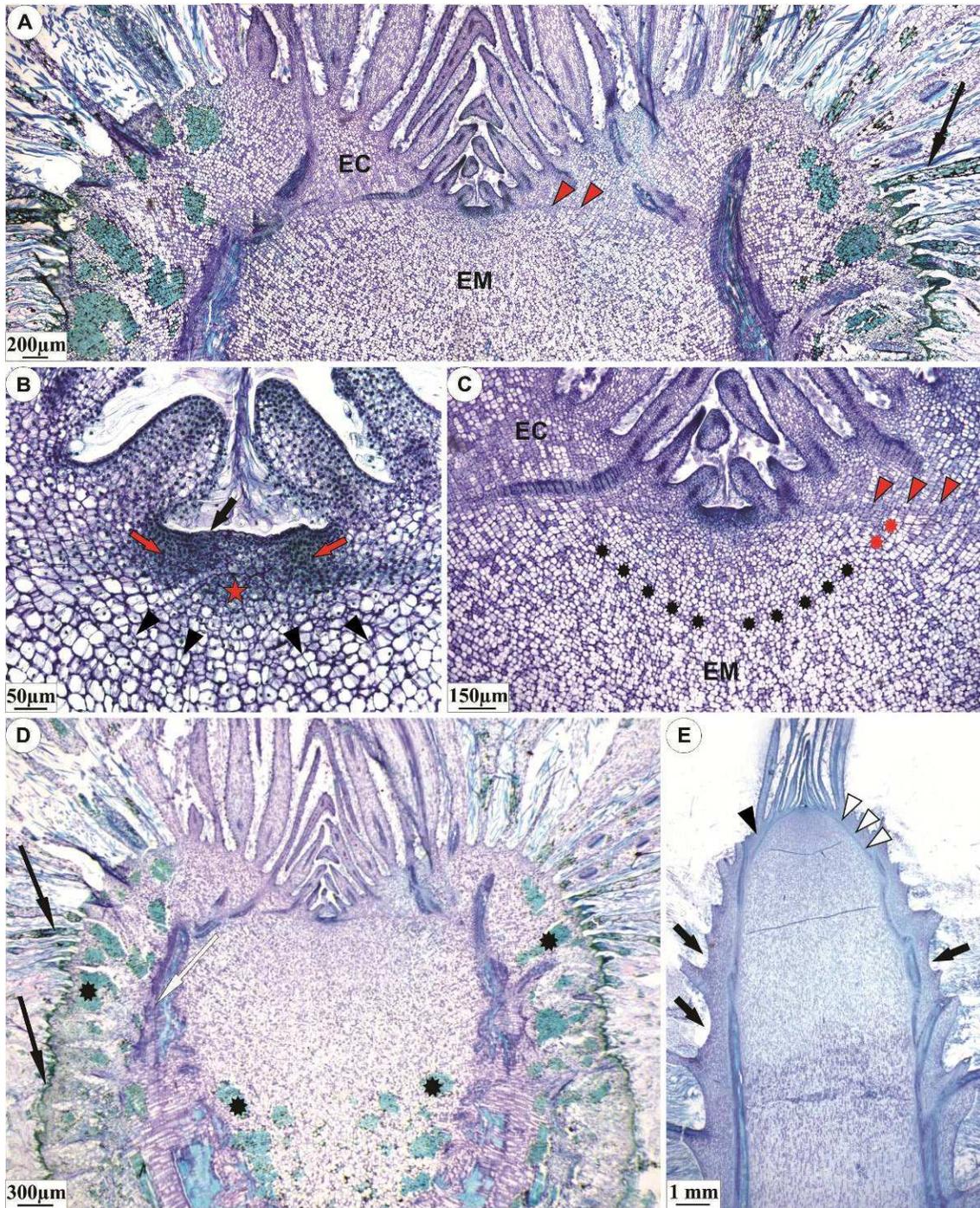


Fig. 3. Caules do tipo 1 – presentes nas espécies com hábito caulirosula. Secções longitudinais. A-D. Indivíduo adulto de *Minasia scapigera*. E. Indivíduo jovem de *Proteopsis argentea*. A. Visão geral da porção apical do caule evidenciando o espessamento medular (EM), o espessamento cortical (EC), o procâmbio localizado horizontalmente (cabeças de seta vermelhas) e os entrenós extremamente curtos. B. Detalhe do ápice meristemático caulinar, evidenciando a porção superior do meristema

originando a protoderme (seta negra), a porção basal originando o meristema medular (estrela vermelha) e as porções laterais formando o meristema periférico (setas vermelhas). No meristema medular são visualizadas divisões anticliniais nas células (cabeças de seta negras). C. Detalhe da região apical demonstrando a ampliação da medula (asteriscos negros), a atividade acentuada do meristema fundamental interno (asteriscosvermelhos) e externo ao procâmbio (cabeças de seta vermelhas) levando à formação das projeções laterais e consequente posicionamento do ápice em depressão. D. Visão geral do caule maduro. Notar sistema vascular secundário (seta branca); grupos de esclereídes corticais e medulares (asteriscos negros) e revestimento secundário formado por camadas suberizadas e folhas suberizadas (setas negras). E. Caule jovem com porção apical alongada e região cortical estreita no ápice (cabeças de seta negras); procâmbio voltado para baixo (cabeças de seta brancas); entrenós mais longos apresentando epiderme com indumento (setas negras).

Tipo 2 - Esse grupo compreende todos os gêneros de Lychnophorinae que apresentam hábito subarbutivo, arbustivo, arbóreo ou arvoretas. O caule, nesses grupos pode apresentar eixo principal de crescimento monopodial e ramos secundários de disposição variada (Fig. 2F-G), geralmente ocorrendo em árvores e arvoretas nos gêneros *Eremanthus*, *Gorceixia*, *Hololepis*, *Lychnophora*, *Lychnophoriopsis*, *Paralychnophora*, *Heterocoma* e *Anteremanthus*. O caule também pode apresentar eixo principal de crescimento simpodial (Fig. 4A), no caso de arbustos e subarbutos, nos gêneros *Blanchetia*, *Chronopappus*, *Piptolepis* e espécies de *Lychnophora* do clado 'Bahian *Lychnophora*'. Podem ocorrer entrenós curtos (Fig. 4B), comumente observados em *Lychnophora* e *Heterocoma* ou mais longos (Fig. 4C) nos demais grupos. Mesmo quando ocorrem entrenós curtos, o caule é menos congestionado do que nas espécies caulirosuladas. A cobertura caulinar é caracterizada pela presença de indumento (Fig. 4C) e pode também apresentar folhas sobrepostas, nas porções apicais caulinares (Fig. 4B) nos gêneros *Lychnophora*, *Paralychnophora*, *Heterocoma* e *Chronopappus*. A cobertura em porções

subapicais do caule pode apresentar, além do indumento, folhas marcescentes (em *Heterocoma*) (Fig. 4D) ou partes delas, especialmente partes da bainha (na Aliança *Prestelia* e em *Paralychnophora*) que permanecem aderidas ao caule até as porções mais basais. O indumento no caule apresenta tricomas glandulares e não glandulares (Fig. 4E-H) e é comumente muito conspícuo (Fig. 4E) ou pouco conspícuo em *Eremanthus* s. str., *E. crotonoides*, *Gorceixia* e *Blanchetia* (Fig. 4F-G). A epiderme caulinar, uniestratificada, pode apresentar estômatos elevados (Fig. 4H) em alguns táxons, como *Choronopappus*, *Eremanthus*, *E. crotonoides*, *Gorceixia*, *Heterocoma* e *Blanchetia*. A maioria das células epidérmicas constitui a célula basal de tricomas (Fig. 4H). Além disso, a epiderme normalmente apresenta cloroplastos conspícuos (Fig. 4I) sendo que esses são ausentes ou pouco evidentes no gênero *Eremanthus* e em *Lychnophora triflora*. Nas porções caulinares apicais, a superfície do caule é sulcada devido à irregularidade do cilindro vascular com feixes vasculares salientes (Fig. 4F) em espécies do clado *Eremanthus* s. str. e em *Gorceixia*.

O córtex comumente apresenta numerosos traços foliares (Fig. 5A), os quais são menos frequentes em parte do clado *Eremanthus*, em *Blanchetia* e nas espécies caulirosuladas. De um modo geral, a medula é ampla, ocupando uma proporção maior do caule, em relação ao córtex (Fig. 4F e 5A). Além disso, nas porções apicais dos caules podem ocorrer esclereídes, no parênquima cortical e, ou no medular (Fig. 5A) nos gêneros *Anteremanthus*, *Lychnophora*, *Minasia*, *Paralychnophora* e *Prestelia*; posteriormente com o crescimento secundário, esclereídes são formadas também no floema secundário (Fig. 5B). Nas porções com espessamento secundário as esclereídes estão sempre presentes, com raras exceções (em *Piptolepis* sp. ined.) (Fig. 5B-C e 5H).

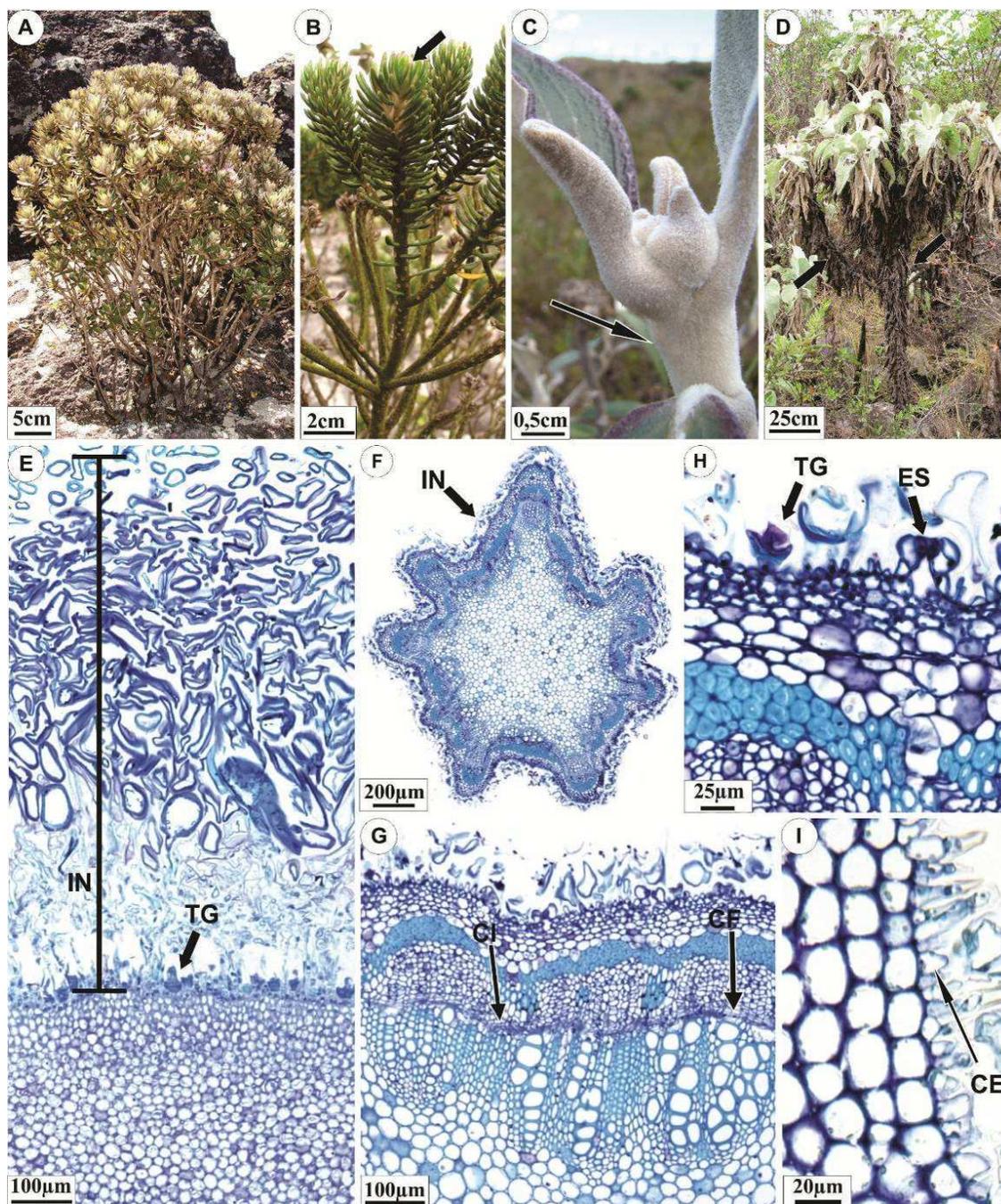


Fig. 4. Caules do tipo 2 – Presente em subarbustos, arbustos, árvores e arvoretas. A-D. Hábitos e características morfológicas. E-I. Secções transversais caulinares. A. *Lychnophora santosii*. B. *L. triflora*. C. *L. tomentosa*. D. *Heterocoma ekmaniana*. E. *Anteremanthus hatschbachii*. F-H. *Eremanthus polycephalus*. I. *Chronopappus bifrons*. A. Habito arbustivo. B. Ramos caulinares com folhas sobrepostas (seta) e entrenós curtos. C. Porção caulinar apical evidenciando entrenó mais alongado (seta). D.

Arvoreta com folhas marcescentes sobre a superfície caulinar (seta). E. Detalhe evidenciando indumento (IN) muito conspícuo (alto e denso) e tricomas glandulares (TG) na superfície caulinar. F. Caule com superfície sulcada e indumento (IN) pouco conspícuo. G. Região caulinar no início do espessamento secundário, demonstrando o câmbio fascicular (CF) e o câmbio interfascicular (CI). H. Porção externa do caule evidenciando estômatos elevados (ES) e tricomas glandulares (TG). I. Detalhe das células epidérmicas (CE) com cloroplastos. Notar que muitas delas constituem a célula basal de tricomas.

As esclereídes podem apresentar dimensões variadas (Fig. 5C) nas espécies do clado Aliança *Prestelia* (exceto em *Prestelia eriopus*) e no clado *Lychnophora ericoides* + *L. gardneri* de *Lychnophora* s.. Nessas espécies, as células corticais primeiramente aumentam de volume e posteriormente se esclerificam, gerando esclereídes maiores que as observadas nos demais tecidos (Fig. 5C). As linhagens *Anteremanthus* e *Eremanthus* s. str., e as espécies *Eremanthus pabstii*, *Hololepis pedunculata* e *Piptolepis ericoides* apresentam endoderme secretora, caracterizada pela presença de gotículas de material lipofílico (Fig. 5D).

Os caules do tipo 2 apresentam espessamento através de crescimento secundário usual, ou seja, pela instalação do câmbio e desenvolvimento dos tecidos vasculares secundários (Fig. 4G). No entanto, como nas espécies caulirosuladas, o revestimento secundário é formado por camadas de células suberizadas, as quais são descontínuas no órgão e não formam uma periderme propriamente dita, pois não há felogênio (Fig. 5E-F). A suberização geralmente se inicia nas camadas externas do córtex, onde grupos de células se dividem periclinalmente e originam as camadas de células que se suberificam (Fig. 5E-F). Posteriormente pode ocorrer a formação de camadas suberificadas adicionais na porção

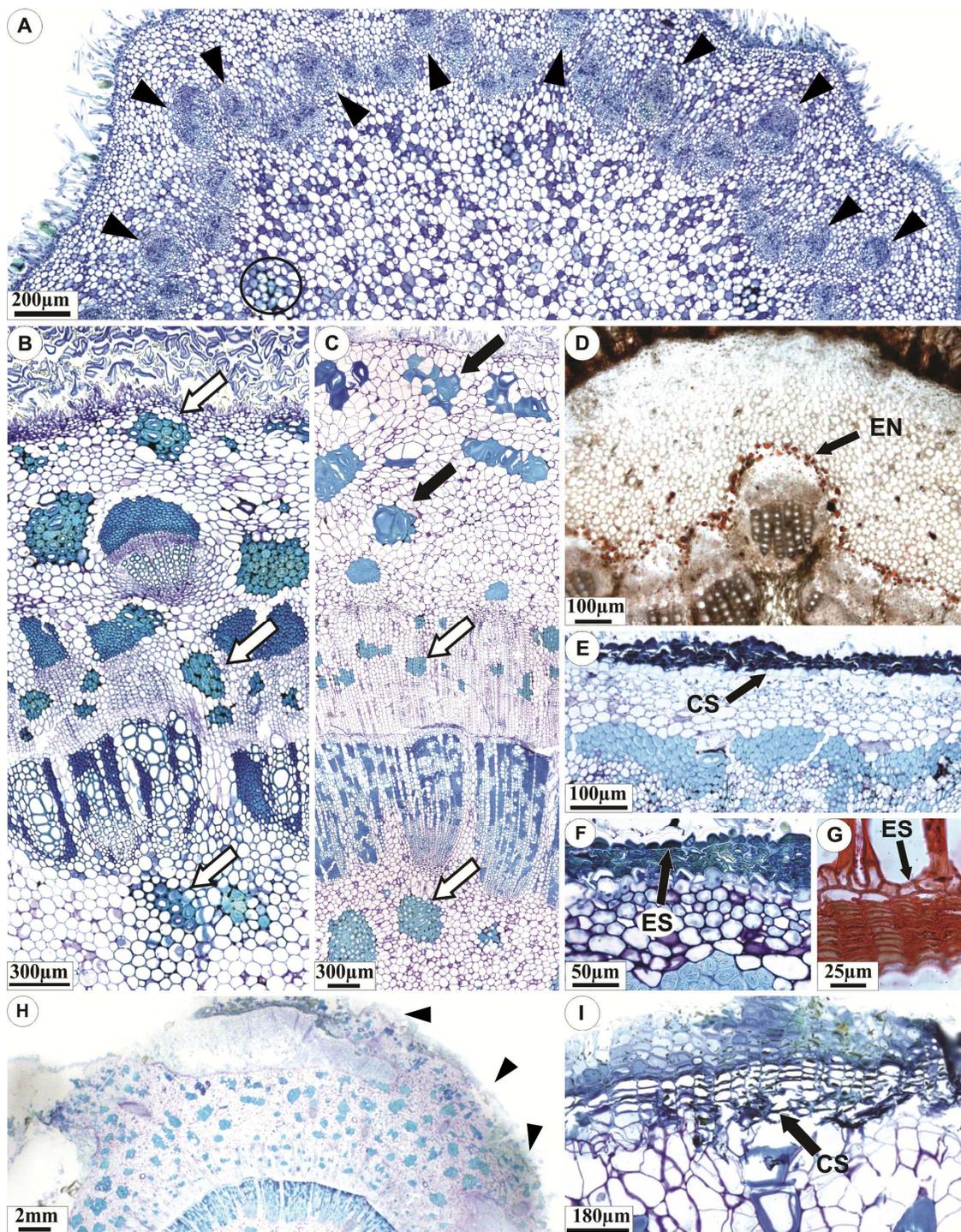


Fig. 5. Caules do tipo 2. A-B. *Lychnophora diamantinana*. C e H-I. *L. tomentosa*. D e G. *Anteremanthus hatschbachii*. E-F. *Eremanthus polycephalus*. Secções transversais caulinares. A. Porção caulinar terminal com numerosos traços foliares (cabeças de seta) e grupo de esclereídes na medula (círculo). B-C. Porções caulinares em crescimento

secundário evidenciando grupos de esclereídes presentes no córtex, no floema secundário e na medula; em B, esclereídes do mesmo tamanho (setas); em C, esclereídes com diferentes dimensões (setas negras = esclereídes corticais maiores; setas brancas = esclereídes medulares e floemáticas menores). D. Secção caulinar com endoderme secretora, apresentando gotículas de material lipofílico evidenciado pelo Sudan IV. E-F. Início da formação do revestimento secundário com camadas celulares suberizadas (CS) descontínuas; em F detalhe dessas camadas e da epiderme suberizada (ES). G. Suberização da epiderme (ES) e das camadas originadas no córtex, evidenciada pelo Sudan IV. Notar porção do indumento igualmente suberizada. H. Porção subapical caulinar com bainha foliar aderida ao caule (cabeças de seta). I. Detalhe da bainha foliar evidenciando processo de suberização da porção externa semelhante ao observado no caule, com camadas suberizadas (CS).

externa do floema secundário. Além disso, a epiderme com indumento pode se suberizar (Fig. 5G) e, em alguns casos, pode ser mantida até as porções lenhosas que se ramificam dos troncos basais. A epiderme remanescente sobre ramos lenhosos está presente nos gêneros *Heterocoma* e *Lychnophora* (clado *Lychnophora* s. str. e clado de espécies de *Lychnophora* da Aliança *Prestelia*). Nas espécies em que partes da folha (geralmente parte da bainha) permanecem aderidas ao caule nas porções subapicais, essas porções também se suberificam (Fig. 5H-I) (clado Aliança *Prestelia* e gênero *Paralychnophora*).

Os caracteres morfológicos e anatômicos caulinares que distinguem os principais táxons de *Lychnophorinae* estão sintetizados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracteres morfológicos e anatômicos caulinares para os principais táxons de Lychnophorinae e grupos externos

Caracteres	Taxa																	
	Po	Cp	Bl	Go	Ec	AP	Pre	Ah	Ch	Pro	Het	Par	Min	BL	Pip	Lyc	Ere	
1 Eixo caulinar monopodial curto (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
2 Espessamento apical medular e cortical (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
3 Entrenós reduzidos (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0,1	1	0	0	1	0,1	0	1	1	0	1	0	
4 Cobertura da porção apical (1-tricomas; 2-folhas sobrepostas; 3-ambos)	1	1	1	1	1	1,3	2	1	3	2	1,3	1,3	2	3	1	3	1	
5 Cobertura da porção subapical (1-tricomas; 2-folhas marcescentes ou partes delas; 3-ambos)	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	1	1	1	
6 Indumento conspícuo (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0,1	-	1	1	-	1	0,1	-	1	1	1	0	
7 Cloroplastos conspícuos na epiderme (0-ausente; 1-presente)	0	0	1	1	0	1	-	0	1	-	1	1	-	0,1	1	1	0,1	
8 Estômatos elevados (0-ausente; 1-presente)	0	0	1	1	1	1	-	0	1	-	1	0	-	0	0	0	1	
9 Feixes vasculares salientes na superfície da porção terminal (0-ausente; 1-presente)	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	
10 Traços foliares nas porções terminais (0-menos que dez; 1-mais que 10)	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0,1	
11 Esclereídes nas porções terminais (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0,1	0	0,1	0	
12 Esclereídes diferentes entre os tecidos do caule (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	
13 Endoderme secretora (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	1	
14 Epiderme suberizada e com indumento sobre ramos lenhosos (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0,1	-	0	0	-	1	0	-	0	0	1	0	

Táxons: **Po:** *Piptocarpa oblonga*; **Cp:** *Chresta pacourinoides*; **Bl:** *Blanchetia*; **Go:** *Gorceixia*; **Ec:** *Eremanthus crotonoides*; **AP:** Aliança *Prestelia*; **Pre:** *Prestelia*; **Ah:** *Antheremanthus hatschbachii*; **Ch:** *Chronopappus*; **Pro:** *Proteopsis*; **Het:** *Heterocoma*; **Par:** *Paralychnophora*; **Min:** *Minasia*; **BL:** ‘Bahian *Lychnophora*’; **Pip:** *Piptolepis*; **Lyc:** *Lychnophora* s. str.; **Ere:** *Eremanthus* s. str.. (-) = dado ausente devido à ausência de epiderme sobre caules adultos das espécies caulirosuladas.

Folhas

Forma - As folhas das espécies de Lychnophorinae podem apresentar secções transversais com formas muito variadas. A lâmina é comumente plana (Fig. 6A-B, E-G) ou ondulada (Fig. 6C-D) em *Chronopappus*, *Heterocoma* e *Proteopsis*. Além disso, pode apresentar criptas voltadas à face abaxial (Fig. 6F) em *Anteremanthus*, *Lychnophora*, *Paralychnophora*, *Prestelia* e *Proteopsis*. A lâmina pode apresentar margem revoluta (Fig. 6F-G) em *Lychnophora*, *Paralychnophora* e *Prestelia*, ou plana (Fig. 6B) nos demais táxons. A nervura central pode ser volumosa (Fig. 6D-E) ou não (Fig. 6A e 6G) quando comparada ao restante da lâmina, podendo atingir de cinco a 15 vezes a espessura da mesma (Fig. 6D-E) em *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Heterocoma*, *Paralychnophora* e *Proteopsis*. Quanto ao contorno, a nervura central pode apresentar cinco diferentes padrões:

Padrão A - arredondada ou plana adaxialmente e arredondada abaxialmente (Fig. 6G-H) em *Blanchetia* e *Gorceixia*, no clado ‘Bahian *Lychnophora*’ e em *Piptolepis*;

Padrão B - com uma projeção acentuada na face adaxial, sendo arredondada na face abaxial (Fig. 6I) ocorrendo em *Eremanthus* s. str., *Eremanthus crotonoides* e *Hololepis pedunculata*;

Padrão C - com uma constrição característica (*neck-like*) na face abaxial (Fig. 6F e 6J-L) nos clados Aliança *Prestelia* (com exceção de *Hololepis pedunculata*), *Lychnophora* s. str. e *Paralychnophora* e na espécie *Lychnophora syncephala*. Nesses táxons a nervura pode exibir variações na face adaxial, sendo plana (Fig. 6F), suavemente elevada (Fig. 6J-K) ou com uma depressão central (Fig. 6L), e em relação à face abaxial, sempre apresentando a

construção (*neck-like*) (Fig. 6F e 6J-L), seguida por uma projeção totalmente arredondada (Fig. 6F e 6J-K) ou com superfície plana (Fig. 6L);

Padrão D - suavemente elevada em ambas as superfícies, em *Minasia* (Fig. 6A);

Padrão E - plana ou elevada adaxialmente e acentuadamente projetada abaxialmente em *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Heterocoma* e *Proteopsis*, com superfície abaxial arredondada (Fig. 6C-E) ou menos comumente plana.

Os feixes vasculares na nervura central comumente apresentam arranjo simples, sendo organizados em uma única fileira de feixes, disposta horizontalmente (Fig. 6L), ou em 'V' (Fig. 6E), e, menos comumente, em *Paralychnophora*, podem apresentar arranjo múltiplo (Fig. 6J), com duas fileiras de feixes concêntricas em forma de 'C' e feixes dispostos aleatoriamente. No parênquima incolor da nervura central podem ser visualizadas esclereídes.

Epiderme - As células epidérmicas podem ser altas ou volumosas na face adaxial (Fig. 6G, 6M e 6O), quando comparadas às células do mesofilo e nesses casos, geralmente apresentam espessamento parietal péctico, essa característica é comum nos clados *Eremanthus* s. str., *Lychnophora* s. str. e 'Bahian *Lychnophora*'. Na face abaxial, as células epidérmicas são geralmente menores que na face oposta (Fig. 6F-G e 6L). As células epidérmicas podem apresentar cutícula espessa na face adaxial (quando a mesma possui um quarto da altura da célula ou mais) (Fig. 6M-N) em *Anteremanthus*, *Eremanthus* s. str., *Lychnophora* s. str. e 'Bahian *Lychnophora*', em *Paralychnophora* e na Aliança *Prestelia*. Além disso, a epiderme apresenta cloroplastos em todos os grupos estudados, localizados principalmente na face adaxial, mas os mesmos são conspícuos - três ou mais cloroplastos por célula epidérmica - somente em alguns grupos (Fig. 6O).

De um modo geral, a epiderme é uniestratificada na subtribo, no entanto, em *Paralychnophora*, foi observado que a epiderme na face adaxial pode se apresentar esporadicamente biestratificada (Fig. 6N), ou seja, a epiderme apresenta uma célula ou duas, intercaladamente. Estudos de primórdios foliares demonstraram que divisões esporádicas ocorrem na protoderme (Fig. 6P).

A maioria das espécies apresenta estômatos apenas na superfície abaxial (Fig. 6M), mas estes podem também ocorrer em ambas as faces: em *Minasia* são distribuídos uniformemente (folha anfiestomática) (Fig. 6B); em *Heterocoma* e *Proteopsis* são mais concentrados na face abaxial e adaxialmente próximos às nervuras maiores (folhas anfihipoestomáticas) (Fig. 6Q).

Os tricomas glandulares podem ocorrer em ambas as faces (Fig. 6R) nos cladós *Blanchetia* + *Gorceixia*, *Eremanthus* s. str., *Minasia* e em *Hololepis*, *E. pabstii* e *E. leucodendron*. Esses tricomas podem ocorrer alternativamente somente na face adaxial em *Piptolepis* e na espécie *Lychnophora santosii* (Fig. 6S) ou, mais comumente, apenas na face abaxial (Fig. 6T). Quando presentes na face adaxial, os tricomas glandulares podem ocorrer em depressões epidérmicas nos cladós *Eremanthus* s. str. e *Minasia*, e em *Hololepis*, *Lychnophora santosii* e *Paralychnophora patriciana* (Fig. 6R-S).

Todas as espécies de Lychnophorinae apresentam tricomas não glandulares ou de cobertura, os quais geralmente estão presentes em ambas as faces nos primórdios foliares e folhas jovens. Nas folhas completamente expandidas (ou adultas) o indumento está sempre presente na face abaxial, mas na face adaxial o indumento está presente apenas nas linhagens *Blanchetia* + *Gorceixia*, *Chronopappus*, *Heterocoma*, *Minasia*, *Piptolepis*, *Proteopsis*, e nas

espécies *Eremanthus leucodendron* e *Lychnophora santosii* no clado ‘Bahian *Lychnophora*’ (Fig. 6A-D e 6H). O indumento pode ser conspícuo (alto e denso) apenas na face abaxial (Fig. 6F-G, 6M) em *Lychnophora* sensu lato, nas linhagens *Anteremanthus hatschbachii*, *Chronopappus*, *Eremanthus crotonoides* e *Paralychnophora* e em *Prestelia eriopus*. O indumento pode ser conspícuo em ambas as faces (Fig. 6A-C) nos gêneros *Heterocoma*, *Piptolepis* e *Proteopsis*, no clado *M. alpestris* + *M. scapigera* e em *Eremanthus leucodendron*. Ainda, o indumento pode ser inconspícuo (Fig. 6R) nos clados *Blanchetia* + *Gorceixia*, *Eremanthus* s. str., *M. cabralensis* + *M. ramosa* e em *E. pabstii* e *Hololepis pedunculata*.

Mesofilo - Comumente o mesofilo é bifacial (Fig. 6G, 6M-O e 6Q-R), mas ocorre mesofilo isofacial em *Minasia* (Fig. 7A). *Anteremanthus*, *Paralychnophora* e as espécies de *Lychnophora* pertencentes à Aliança *Prestelia* apresentam hipoderme (Fig. 6N e 7D-E), composta por uma a quatro camadas e originada no meristema fundamental dos primórdios foliares (Fig. 6P). A hipoderme apresenta comumente espessamentos parietais de origem péctica e celulósica (Fig. 7D-E) e também pode apresentar esclereídes (Fig. 7D). A presença da hipoderme contribui para a ocorrência de mesofilo espessado (Fig. 7D-E) e logicamente, a sua ausência está relacionada com mesofilos delgados (Fig. 6G e 6Q-S). Além disso, foi observada apenas em *Minasia* a presença de um parênquima incolor que se localiza na região mediana do mesofilo e conecta os feixes vasculares lateralmente (Fig. 6A-B e 7A), o qual apresenta espessamento parietal péctico discreto e celulósico conspícuo (Fig. 7B).

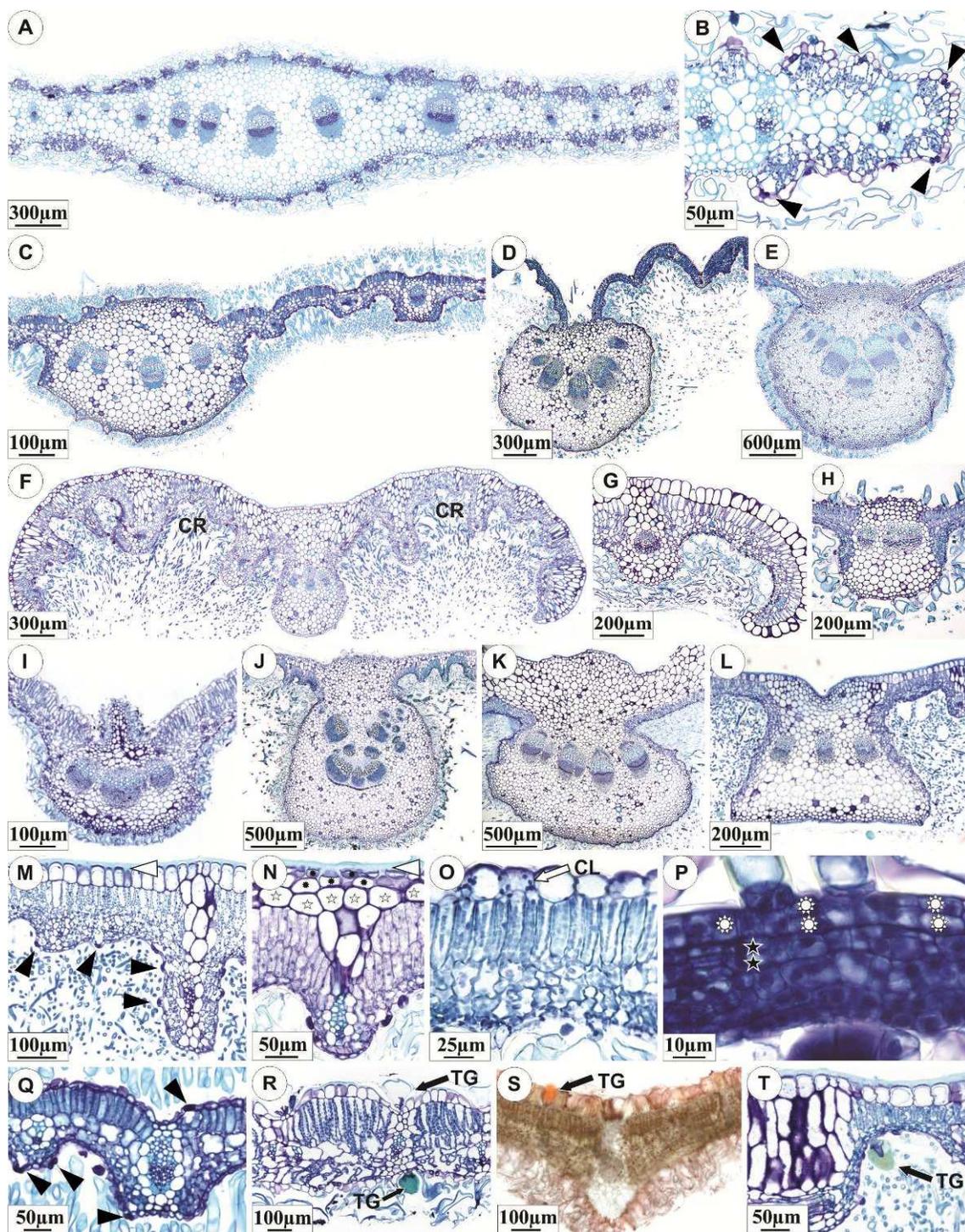


Fig. 6. Caracterização das folhas – formas, epiderme e mesofilo. A-B. *Minasia scapigera*. C e Q. *Proteopsis argentea*. D. *Chronopappus bifrons*. E. *Anteremanthus hatschbachii*. F. *Prestelia eriopus*. G. *Lychnophora triflora*. H e O. *Piptolepis*

monticola. I e R. *Eremanthus polycephalus*. J, N e P. *Paralychnophora bicolor*. K. *L. tomentosa*. L-M e T. *L. diamantinana*. S. *L. santosii*. A-B, E-G. Lâmina plana. C-D. Lâmina ondulada. B. Margem plana. F-G. Margem revoluta. F, J, M-N. Presença de criptas na face abaxial. D-E, J. Nervura central volumosa. A e C-L. Contorno da nervura central: tipo A (G-H); tipo B (I); tipo C (F, J-L); tipo D (A); tipo E (C-E). A,C, D-I. Arranjo dos feixes vasculares na nervura central simples. J. Arranjo dos feixes vasculares na nervura central múltiplo. G e M. Células epidérmicas altas. O. Células epidérmicas de grandes dimensões. M-N. Cutícula espessa. O. Cloroplastos na epiderme. N. Epiderme esporadicamente biestratificada (asteriscos negros) e hipoderme (estrelas brancas). P. Primórdio foliar com protoderme evidenciando divisões em algumas células, gerando epiderme uni e bisseriada intercaladamente (estrelas complexas brancas); notar meristema fundamental dando origem à hipoderme (estrelas negras). B e Q. Estômatos em ambas as faces da folha (cabeças de seta negras). M. Estômatos na face abaxial. R-T. Distribuição dos tricomas glandulares (TG): em ambas as faces da folha (R); na face adaxial (S); na face abaxial (T). G, M-O e Q-R. Mesofilo bifacial. A-B. Mesofilo isofacial.

Feixes vasculares - Em Lychnophorinae os feixes vasculares são sempre colaterais e geralmente alternam-se feixes maiores e menores (Fig. 6A e 6Q). Estes podem ser numerosos (Fig. 6A-C) ou menos frequentes no mesofilo (Fig. 6D).

Extensões de bainha dos feixes - Na maioria das espécies de Lychnophorinae os feixes vasculares são conectados à epiderme em ambas as faces por extensões de bainha dos feixes (Fig. 6M-N, 6Q, 7B e 7G-I), ou essas bainhas conectam os feixes vasculares abaxialmente à epiderme, e adaxialmente à hipoderme (Fig. 7D-F). Em geral, as extensões de bainha dos feixes são constituídas de células volumosas com grandes vacúolos e aclorofiladas (Fig. 6M-N, 7D e 7G). Nessas extensões as células podem exibir paredes celulares que podem ser parenquimatosas (Fig. 7E), colenquimatosas (Fig. 7E e 7H), esclerenquimatosas (Fig. 7B e 7I) - compostas por fibras ou esclereídes, com espessamento parietal celulósico conspicuo e ausência de lignina (dado não mostrado) - ou, na maioria dos casos, com paredes celulares de natureza mista (Fig. 7E e 7H-I). As extensões de bainha dos

feixes podem ser inconspícuas (Fig. 6R) ou conspícuas (Fig. 6M-N 7D-I). Quando são conspícuas, essas extensões podem contribuir para a ocorrência de mesofilo espesso (Fig. 6F e 6M), mesmo em espécies que não apresentam hipoderme como em *Prestelia eriopus*, *Lychnophora diamantinana*, *L. ericoides* e *L. gardneri*.

A localização do parênquima clorofiliano é muito variável entre as espécies de Lychnophorinae. Em *Minasia*, o parênquima clorofiliano é delimitado pela presença do parênquima incolor e pelas extensões de bainha dos feixes, e fica geralmente restrito a setores abaixo dos estômatos (Fig. 6A-B e 7A-C). As extensões de bainha dos feixes conspícuas (que alcançam a epiderme em ambas as faces) restringem o parênquima clorofiliano a setores isolados (Fig. 7G) nos clados *Heterocoma*, *Lychnophora* s. str., *Proteopsis*, e nas espécies *Eremanthus leucodendron*, *Piptolepis monticola*, *P. schultzi* e *Prestelia eriopus*. Além disso, as extensões de bainha dos feixes conspícuas restringem o parênquima clorofiliano a setores entre as extensões e a hipoderme (Fig. 7D-E) nos táxons *Anteremanthus hatschbachii*, *Paralychnophora* e no clado de espécies de *Lychnophora* da Aliança *Prestelia*. Nas demais espécies, o parênquima clorofiliano se distribui ao longo do mesofilo (Fig. 6G e 6O), ocupando o espaço entre a epiderme e o sistema vascular e é caracterizado por uma ou duas camadas de parênquima paliçádico e duas a cinco camadas de parênquima lacunoso.

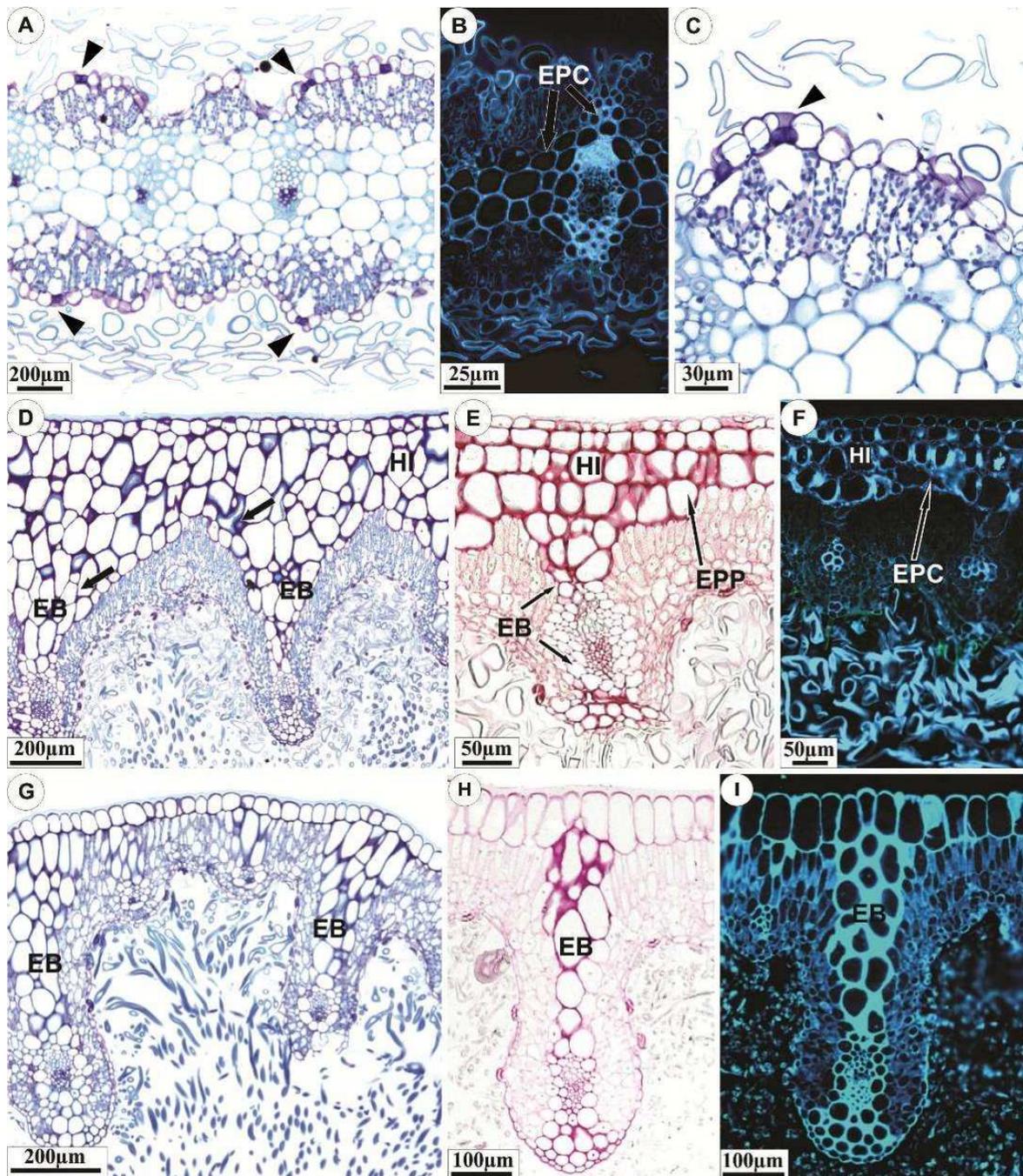


Fig. 7. Caracterização das folhas – mesofilo e extensões de bainha dos feixes. A-C. *Minasia scapigera*. D. *Lychnophora tomentosa*. E-F. *Anteremanthus hatschbachii*. G. *Prestelia eriopus*. H-I. *L. diamantinana*. Em B, F e I. Reações histoquímicas evidenciando espessamentos parietais de natureza celulósica (EPC) pelo Calcofluor White. Em E e H. Reações histoquímicas indicando espessamentos parietais de natureza pécica (EPP) pelo Vermelho de Rutênio nas extensões de bainha (EB) e hipoderme (HI). A-C. Mesofilo isofacial com numerosos feixes vasculares e estômatos em ambas as faces (cabeças de seta

negras em A e C), parênquima incolor na região mediana do mesofilo e extensões de bainha dos feixes (evidenciando espessamento parietal celulósico em B); em A e C, notar arranjo do parênquima clorofiliano restrito à região abaixo dos estômatos. D-F. Mesofilo espessado com hipoderme (HI) e extensões de bainha dos feixes (EB); notar esclereídes em D (setas negras); espessamento parietal péctico e celulósico na hipoderme e nas extensões de bainha dos feixes em E-F. G-I. Mesofilo espessado com extensões de bainha dos feixes (EB), mas sem hipoderme; em G e I, observar espessamento parietal péctico e celulósico pronunciado nas EB.

Os caracteres morfológicos e anatômicos foliares que distinguem os principais táxons de Lychnophorinae estão sintetizados na Tabela 2.

Tabela 2. Caracteres morfológicos e anatômicos foliares para os principais táxons de Lychnophorinae

Caracteres	Taxa																
	Po	Cp	Bl	Go	Ec	AP	Pre	Ah	Ch	Pro	Het	Par	Min	BL	Pip	Lyc	Ere
1 Lâmina foliar (1-plana; 2-ondulada)	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1
2 Margem foliar (1-plana; 2-revoluta)	2	1	1	1	1	1,2	2	1	2	1	1	2	1	1,2	1,2	2	1
3 Dimensão da NC em relação ao mesofilo (1-não-volumosa; 2-volumosa)	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
4 Contorno da NC em secção transversal *	1	2	1	1	2	2,3	3	1	1	5	5	1,3	4	1	1	3	1,2,3
5 Arranjo dos feixes vasculares na NC (1-simples; 2-múltiplo)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,2	1	1	1	1	1
6 Esclereídes (0-ausente; 1-presente)	1	0	0	1	0	0,1	1	1	0	1	0	1	1	1	0,1	0,1	0,1
7 Criptas (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0,1	1	1	0	1	0,1	1	0	0	0	0,1	0
8 Células epidérmicas altas ou volumosas (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	1	1
9 Cutícula espessa na face adaxial (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0,1
10 Cloroplastos conspícuos na epiderme (0-ausente; 1-presente)	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0,1	1	0	0	1	1	0,1
11 Epiderme esporadicamente bisseriada (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12 Estômatos em ambas as faces na folha (0-ausente; 1-presente)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
13 Distribuição dos TG (1-em ambas as faces; 2-AB; 3-AD)	2	2	1	1	2	1,2	2	2	2	1	1,2	1,2	1	1,2,3	1,3	2	1
14 TG em depressões epidérmicas/AD (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,1	1	0,1	0	0	1
15 Indumento na folha adulta (1-AB; 2- ambas as faces)	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2,1	1	1	1
16 Indumento conspícuo na folha adulta (0-inconspícuo; 1- AB; 2-ambas as faces)	0	0	0	0	1	0,1	1	1	1	2	2	1	0,2	1,2	0,2	1	0
17 Simetria do mesofilo (1-isofacial; 2-bifacial)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
18 Espessura do mesofilo (0-delgado; 2-espessado)	1	1	1	1	1	1,2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1,2	1
19 Hipoderme (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0,1	0	1	0	0	0,1	1	0	0	0	0	0
20 Parênquima incolor na região mediana do mesofilo (0-ausente; 1-presente)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0	0	0

Tabela 2. Caracteres morfológicos e anatômicos foliares para os principais táxons de Lychnophorinae

Caracteres	Taxa																
	Po	Cp	Bl	Go	Ec	AP	Pre	Ah	Ch	Pro	Het	Par	Min	BL	Pip	Lyc	Ere
21 Numerosos feixes vasculares (0-ausente; 1-presente)	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0,1	1	1	0,1	0	0,1	0,1
22 Extensão de bainha do feixe (EBF) (0-ausente; 1-presente)	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0,1	1	1	0,1	0,1	0,1	1
23 Caracterização da EBF (0-ausente; 1-esclerenquimatosa; 2-mista: parenquimatosa, colenquimatosa e esclerenquimatosa)	1	0	0	0	0	2	2	2	2	2	0,2	2	2	0,1,2	0,1,2	0,2	1,2
24 Localização do parênquima clorofiliano (1-restrito a setores abaixo dos estômatos; 2-entre a hipoderme e as EBF; 3-entre as EBF conspícuas; 4-em todo o mesofilo)	3	4	4	4	4	2,4	3	2	4	3	2,3,4	2	1	3,4	3,4	3,4	4

Táxons: **Po:** *Piptocarpa oblonga*; **Cp:** *Chresta pacourinoides*; **Bl:** *Blanchetia*; **Go:** *Gorceixia*; **Ec:** *Eremanthus crotonoides*; **AP:** *Aliança Prestelia*; **Pre:** *Prestelia*; **Ah:** *Antheremanthus hatschbachii*; **Ch:** *Chronopappus*; **Pro:** *Proteopsis*; **Het:** *Heterocoma*; **Par:** *Paralychnophora*; **Min:** *Minasia*; **BL:** ‘Bahian *Lychnophora*’; **Pip:** *Piptolepis*; **Lyc:** *Lychnophora* s. str.; **Ere:** *Eremanthus* s. str.. Obs.: As células com dois algarismos ou mais representam mais de um estado do carácter descrito para o taxon.

Abreviações: AB - face abaxial; AD - face adaxial; EBF - extensão de bainha do feixe; NC - Nervura Central; TG - Tricomas glandulares.

*Estados de carácter relativos ao contorno da nervura central: 1-A. arredondada adaxial e abaxialmente; 2-B. projeção acentuada adaxialmente e arredondada abaxialmente; 3-C. plana, suavemente elevada ou com depressão adaxialmente e constrita abaxialmente.; 4-D. plana ou suavemente elevada adaxial e abaxialmente; 5-E. plana ou elevada adaxialmente e acentuadamente elevada abaxialmente.

Mapeamento dos caracteres morfológicos e anatômicos na filogenia de Lychnophorinae

Foi realizada a reconstrução em parcimônia dos estados ancestrais para cada caracter morfológico e, ou anatômico levantado para caules aéreos e folhas nos táxons de Lychnophorinae (Tabela 1 e 2). As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres estão ilustradas nas Figuras 8 a 25 e descritas abaixo.

Caule

As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres caulinares sugerem que alguns caracteres estão diretamente relacionados ao hábito, como o "eixo caulinar principal monopodial curto" (Fig. 8A) e a presença de espessamento apical medular e cortical (Fig. 8B). Esses caracteres foram adquiridos independentemente, para cada um dos grupos representados pelos três gêneros de plantas caulirosuladas (*Prestelia*, *Proteopsis*, *Minasia*), sem nenhuma perda, representando convergências (Fig. 8A e B). Além disso, os caracteres "cobertura da porção apical do caule" e "cobertura da porção subapical do caule" (Fig. 9A), também definem os gêneros de plantas caulirosuladas, pois os mesmos não apresentam tricomas na cobertura caulinar.

Quando se compara o hábito das espécies de Lychnophorinae com a cobertura da porção subapical do caule (Fig. 9B), além da exclusividade de folhas marcescentes ou partes destas para os grupos caulirosulados, observa-se que os grupos que apresentam ambos, "tricomas e folhas marcescentes ou partes destas", num estado único são na maioria arvoretas e tais grupos são os mais próximos filogeneticamente dos grupos caulirosulados. Além disso, a presença de folhas sobrepostas na cobertura da porção apical dos caules ocorre em grande parte nos mesmos grupos que apresentam folhas marcescentes ou partes destas sobre a

porção subapical (Fig. 9A). As reconstruções indicam que há ambiguidade para esses dois caracteres.

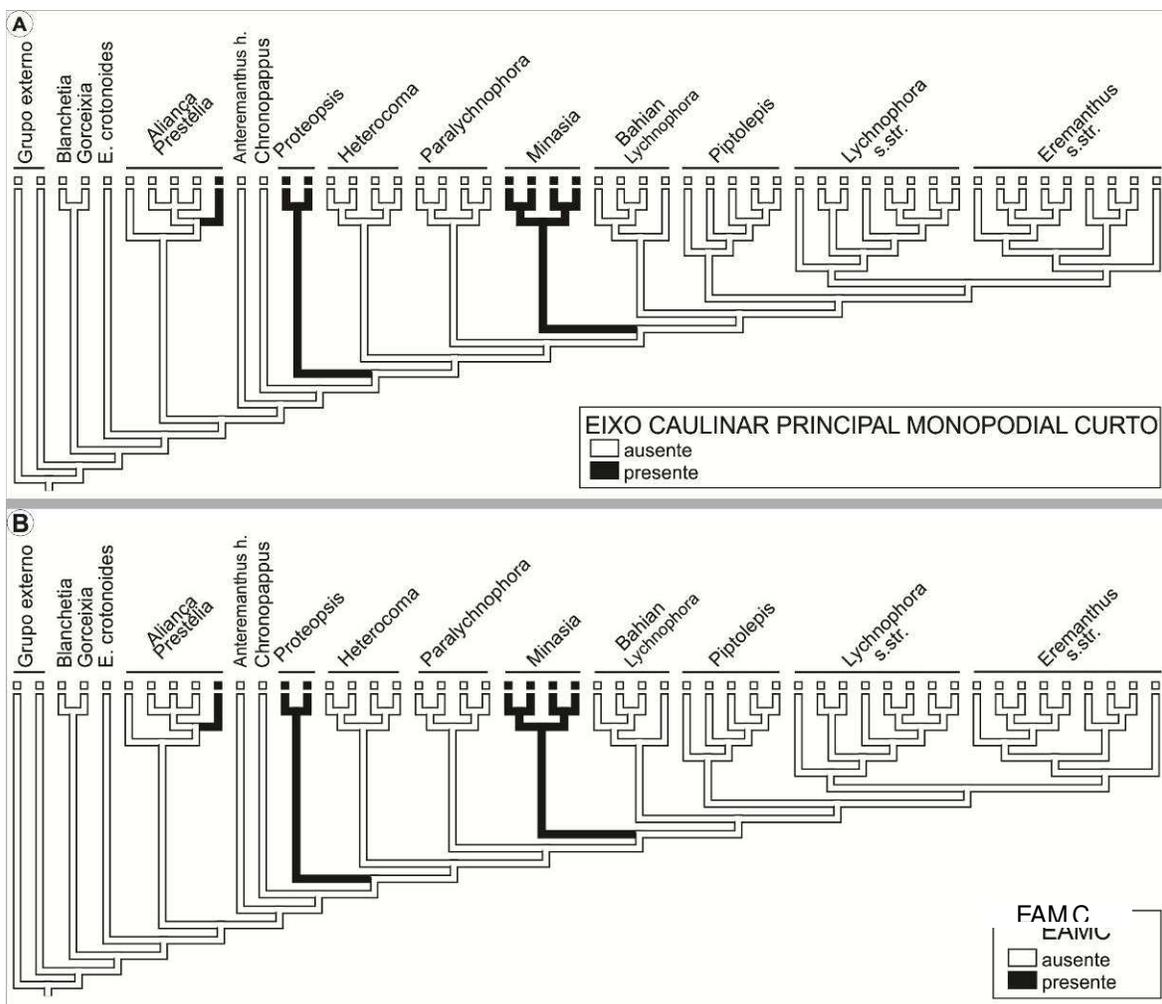


Fig 8. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Eixo caular principal monopodial curto. B. Presença de espessamento apical medular e cortical (EAMC).

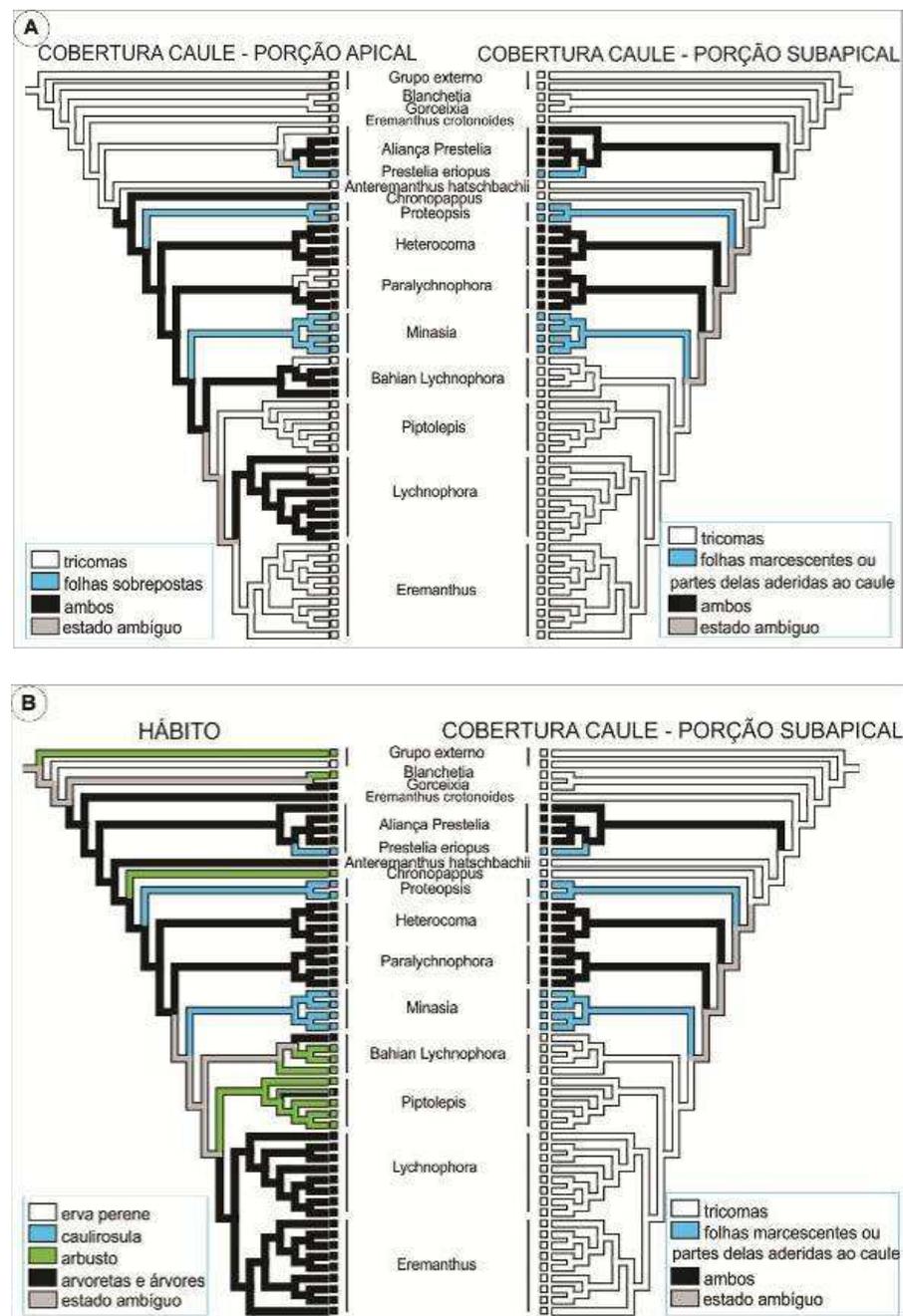


Fig. 9. Cladogramas em espelho representando: A. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter da cobertura caulinar apical e da cobertura caulinar supapical (parcimônia). B. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter do hábito e da cobertura da porção subapical do caule (parcimônia). Em A e B, ‘ambos’ = tricomas + folhas marcescentes ou partes delas aderidas ao caule. Ramos em cinza = estado de caracter indefinido ou ambíguo no ancestral do clado.

Para a cobertura dos caules na porção apical, metade das MPRs (*Most Parsimonious Reconstructions*) indica que o surgimento de folhas sobrepostas pode ter ocorrido três vezes: uma na Aliança *Prestelia* (exceto em *Hololepis*); outra no ancestral de *Chronopappus*, sendo compartilhada por linhagens posteriores, com perda no ancestral das linhagens mais "derivadas" (*Piptolepis*, *Eremanthus* s. str. e *Lychnophora* s. str.); e a terceira em *Lychnophora* s. str. As demais MPRs indicam que o surgimento de folhas sobrepostas pode ter ocorrido duas vezes: na Aliança *Prestelia* e no ancestral de *Chronopappus*, nesse caso com perda para o clado *Piptolepis* e *Eremanthus* s. str.. Todas essas reconstruções também indicaram perdas no clado *Paralychnophora bicolor* + *P. harley* e nas espécies *Eremanthus leucodendron* e *Lychnophora crispa* (Fig. 9A).

Considerando a cobertura dos caules na porção subapical, a maioria das MPRs indica que as folhas marcescentes ou parte delas aderidas ao caule teriam surgido duas vezes, uma para Aliança *Prestelia* e outra para o ancestral de *Proteopsis* e para as linhagens subsequentes, sendo que o carácter teria sido perdido no ancestral de 'Bahian *Lychnophora*' e em diante (Fig. 9A).

O mapeamento dos caules com entrenós reduzidos coincide em grande parte com a presença de folhas sobrepostas (e, ou tricomas) sobre a porção apical do caule (Fig. 10A). Para os caules com entrenós reduzidos há duas hipóteses. A MPR 1 indica três aquisições, a primeira teria sido no clado Aliança *Prestelia* (exceto em *Hololepis* e com perda em *Lychnophora tomentosa*), a segunda no ancestral de *Proteopsis* e linhagens posteriores (com perdas em *Eremanthus* s. str., *Piptolepis* e *Paralychnophora*) e a terceira na espécie *L. syncephala*. A MPR 2 indica quatro aquisições: a mesma para Aliança *Prestelia* e para o

ancestral de *Proteopsis* e linhagens posteriores, no entanto nessa segunda aquisição o caracter teria sido perdido no ancestral das linhagens mais "derivadas" (*Piptolepis*, *Eremanthus* s. str. e *Lychnophora* s. str.), ocorrendo uma nova aquisição (terceira) em *Lychnophora* s. str. e a quarta aquisição em *L. syncephala* (Fig. 10A).

A presença de cloroplastos conspícuos na epiderme caulinar coincide amplamente com a presença de indumento muito conspícuo no caule, com exceção do clado mais "basal" *Blanchetia* + *Gorceixia*, que apresentam cloroplastos conspícuos e não apresentam indumento conspícuo (Fig 10B). Para a ocorrência de epiderme com cloroplastos conspícuos, metade das MPRs indicam que o caracter já estava presente no ancestral comum mais recente (ACMR) de Lychnophorinae, sendo distribuído por quase toda a subtribo, com uma única aquisição (no ACMR) ou duas (no ACMR e em *Lychnophora regis*). As outras MPRs indicam uma aquisição no clado mais "basal" (*Blanchetia* + *Gorceixia*), outra no ancestral do clado Aliança *Prestelia* e das linhagens subsequentes e possivelmente uma terceira em *Lychnophora regis*. Todas as reconstruções indicam perdas nas linhagens de espécies caulirosuladas (cujos caules são completamente aclorofilados) e em *Eremanthus* s. str., além de diferentes hipóteses para o clado 'Bahian *Lychnophora*'.

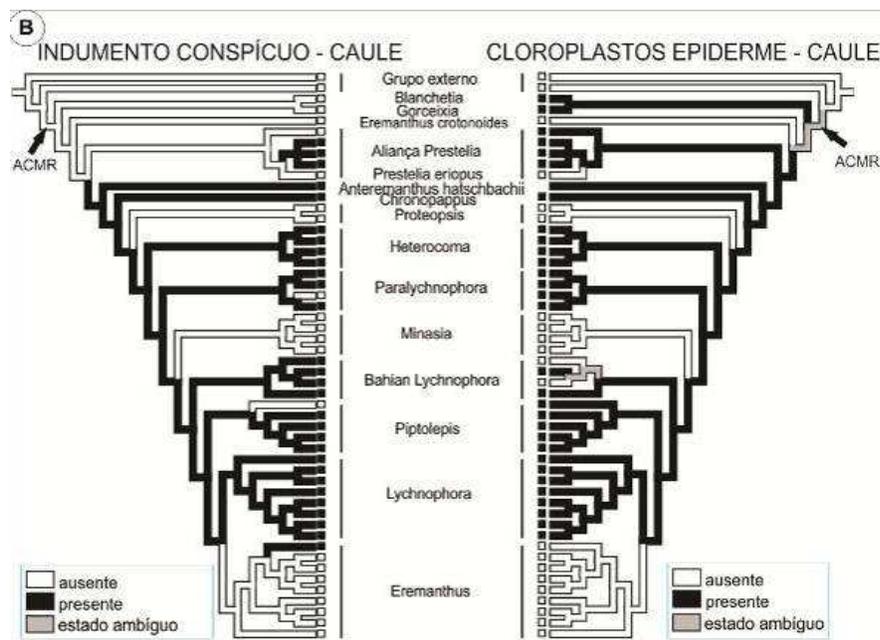


Fig. 10. Cladogramas em espelho representando: A. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter da cobertura caulinar apical e da ocorrência de caule com entrenós reduzidos (parcimônia). B. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter relacionando o indumento muito conspícuo no caule e a presença de cloroplastos na epiderme caulinar (parcimônia). Em A ‘ambos’ = tricomas + folhas sobrepostas. Ramos em cinza = estado de caracter indefinido ou ambíguo no ancestral do clado.

Ainda, a ocorrência de indumento muito conspícuo no caule coincide em grande parte com a presença de folhas sobrepostas e tricomas na porção apical do caule (Fig. 11). O indumento muito conspícuo no caule foi adquirido três vezes, sendo duas dessas aquisições independentes (clado das espécies de *Lychnophora* do Clado Aliança *Prestelia* e na espécie *Lychnophora syncephala*) e uma delas no ancestral de *Anteremanthus*, sendo compartilhada pelas linhagens seguintes até ser perdida no clado mais “derivado” *Eremanthus* s. str.. Ocorreram cinco perdas ao todo. Além de *Eremanthus* s. str., duas das cinco perdas correspondem a grupos de espécies caulirosuladas (as quais logicamente não apresentam indumento por apresentarem epiderme caulinar inconspícua, restrita a gema caulinar). As

duas perdas restantes ocorreram independentemente (em *Paralychnophora patriciana* e *Eremanthus pabstii*).

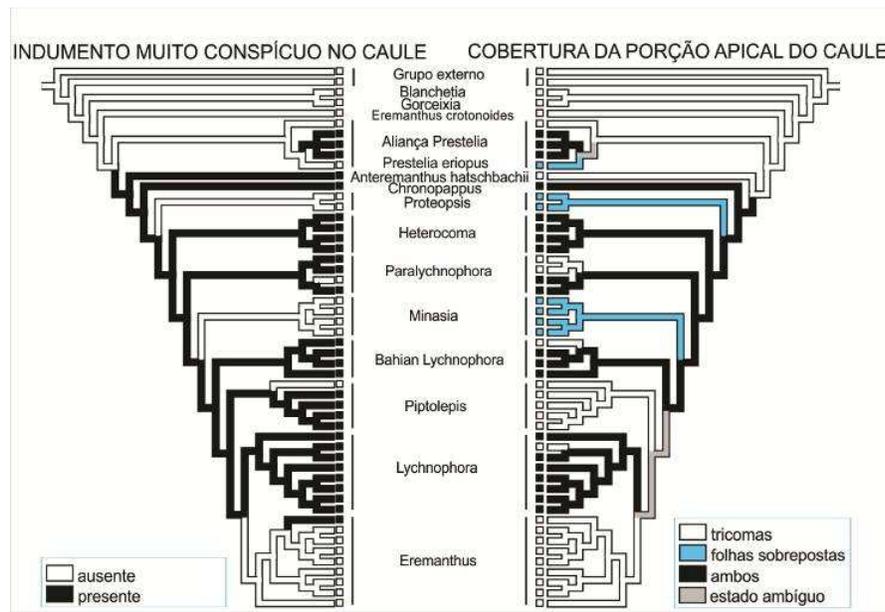


Fig. 11. Cladogramas em espelho do indumento muito conspícuo no caule e da cobertura da porção apical do caule. ‘ambos’ = tricomas + folhas sobrepostas.

Quanto à presença de estômatos elevados no caule (Fig. 12A) as reconstruções indicam ambiguidade, com número de aquisições variável (de duas a seis). Contudo a maioria das MPRs indica que o caracter estava presente no ACMR das Lychnophorinae. Além disso, o caracter é bastante informativo, pois a presença define seis táxons distintos (*Blanchetia* + *Gorceixia*, *E. crotonoides*, *Chronopappus*, *Heterocoma* e *Eremanthus* s. str.) com apenas uma perda em um deles (*Eremanthus glomerulatus*), e apenas uma aquisição independente na Aliança *Prestelia* (*Hololepis*) (Fig. 12A).

A presença de superfície caulinar sulcada também define dois táxons em Lychnophorinae (*Gorceixia* e *Eremanthus* s. str.). Possivelmente ocorreram duas aquisições

nesses táxons com uma única perda em *Eremanthus* (clado *E. glomerulatus* + *E. incanus* + *E. argenteus*) ou teriam ocorrido três aquisições independentes (uma em *Gorceixia* e duas em *Eremanthus* s. str.); esse carácter se apresenta também em um dos grupos externos (*Chresta*) (Fig. 12B).

A presença de traços foliares numerosos nas porções terminais do caule é amplamente observada na subtribo (Fig. 12C) , sendo que a sua ausência é mais informativa, pois caracteriza as linhagens de espécies caulirosuladas, assim como dois clados dentro de *Eremanthus* s. str., e está ausente também em uma linhagem “basal” (*Blanchetia*).

A presença de esclereídes nas porções terminais do caule (Fig. 13A) define seis clados: Aliança *Prestelia* (exceto *Hololepis*), *Paralychnophora*, *Minasia*, ‘Bahian *Lychnophora*’ (exceto o clado *L. regis* + *L. triflora*) e *Lychnophora* s. str. (exceto *L. pinaster*). A ocorrência de esclereídes nas porções terminais do caule surgiu cinco vezes.

Além disso, a ocorrência de diferentes esclereídes (diferenças de forma e tamanho) entre os tecidos do caule definem dois grupos distintos Aliança *Prestelia* (com exceção de *Prestelia*) e o clado formado por *Lychnophora ericoides* + *L. gardneri* (Fig. 13B). As reconstruções para o estado heterogêneo indicam duas hipóteses: MPR1, com duas aquisições (uma no ancestral da Aliança *Prestelia* e outra no ancestral de *L. ericoides* + *L. gardneri*) e MPR2, com três aquisições (duas na Aliança *Prestelia* e a terceira no ancestral de *L. ericoides* + *L. gardneri*).

A endoderme secretora aparece em duas linhagens distintas (*Anteremanthus* e *Eremanthus* s. str.) sem perdas, e em mais três aquisições independentes, uma na Aliança

Prestelia (Hololepis) e duas no clado *Piptolepis (Eremanthus pabstii e Piptolepis ericoides)* (Fig. 13C).

Além disso, a epiderme remanescente sobre ramos lenhosos define três clados (*Lychnophora* s. str., *Heterocoma* e o clado de espécies de *Lychnophora* da Aliança *Prestelia*) (Fig. 14).

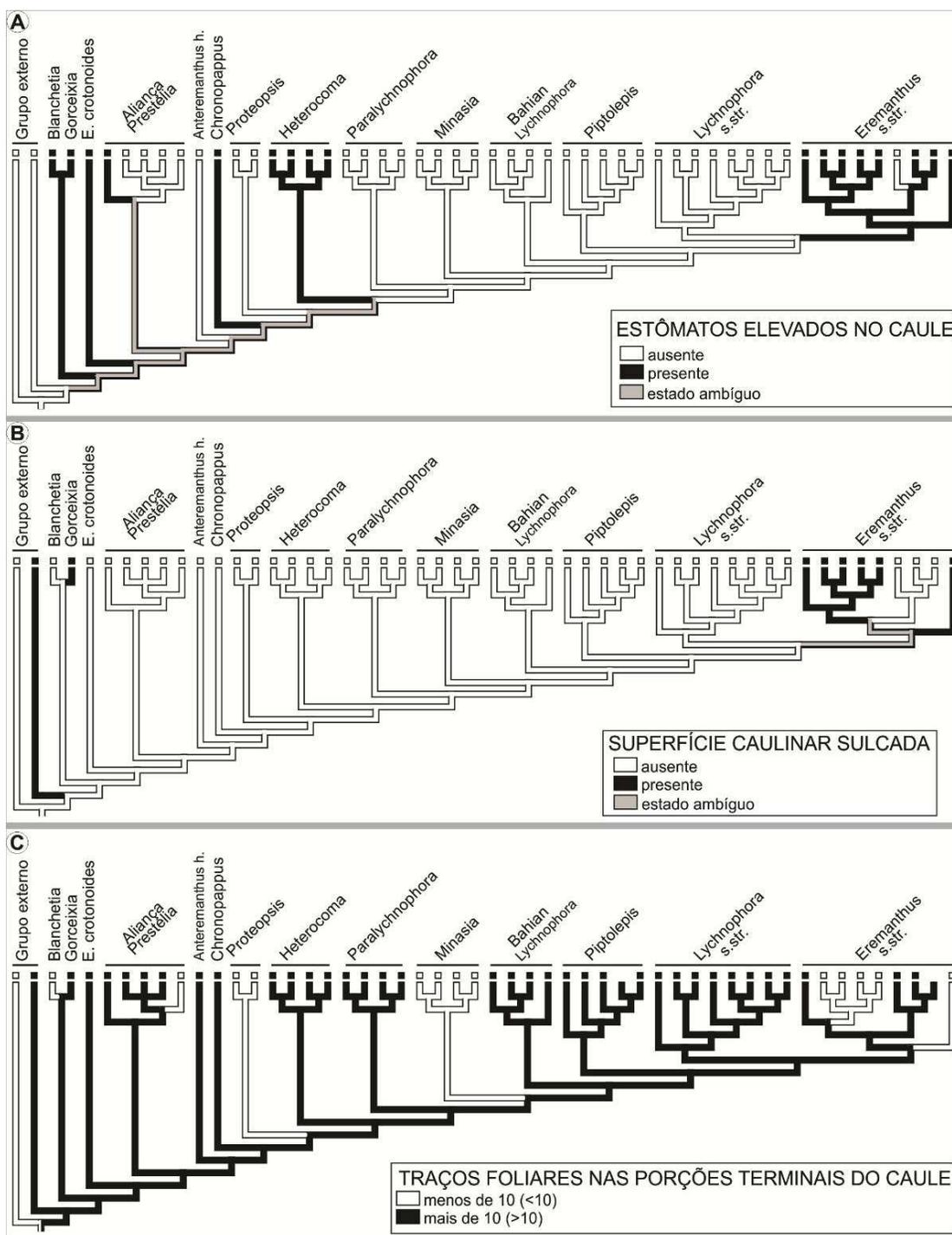


Fig. 12. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Estômatos elevados no caule. B. Feixes vasculares salientes na superfície do caule. C. Traços foliares nas porções terminais do caule. Ramos em ‘preto e branco’ = estado de carácter indefinido ou ambíguo no ancestral do clado.

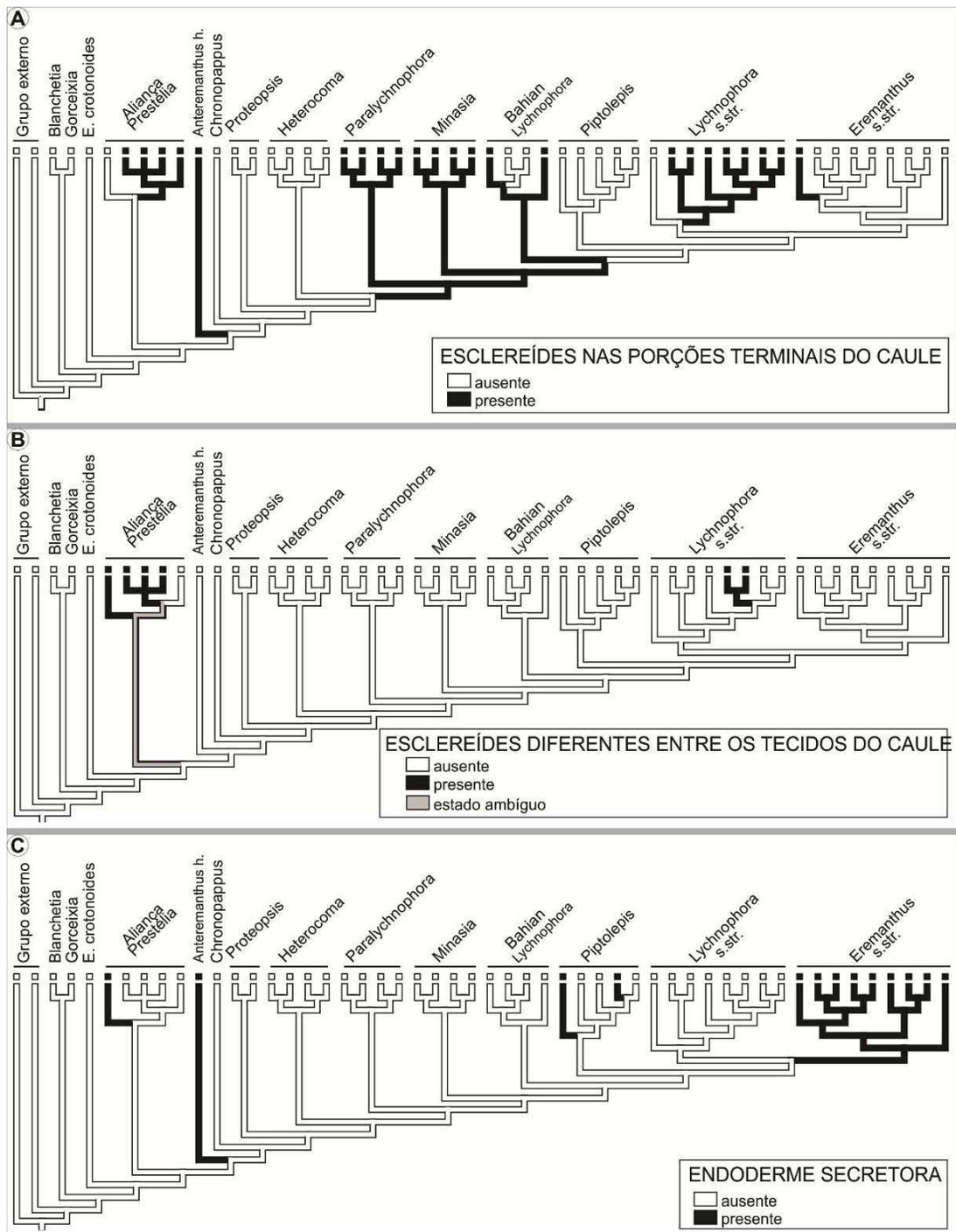


Fig. 13. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Esclereídes nas porções terminais do caule. B. entre os tecidos do caule. C. Endoderme secretora. Ramos em ‘preto e branco’ = estado de carácter indefinido ou ambíguo no ancestral do clado.

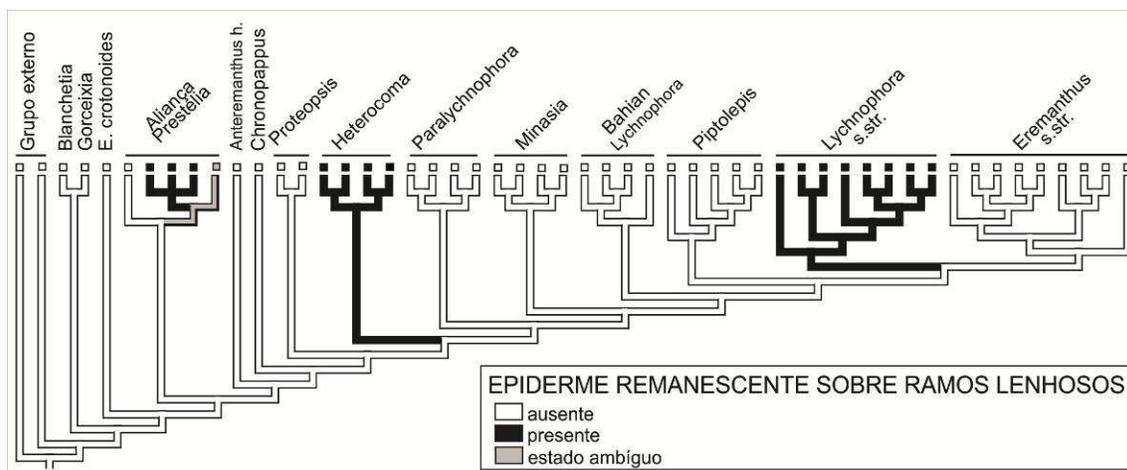


Fig. 14. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) da presença de epiderme remanescente sobre ramos lenhosos.

Folha

As folhas de Lychnophorinae exibem grande número de variações e por isso, apresentam maior número de caracteres informativos para a delimitação dos grupos taxonômicos, quando comparadas aos caules. As reconstruções indicam que no ACMR das Lychnophorinae a lâmina foliar era plana (Fig. 15A) sendo que o estado ondulado foi adquirido uma única vez e define os gêneros *Chronopappus*, *Proteopsis* e *Heterocoma*, sendo provavelmente uma sinapomorfia para esse grupo. O estado foi perdido uma vez para todas as linhagens "derivadas" que representam o grupo-irmão de *Heterocoma*.

As reconstruções indicam que a margem foliar (Fig. 15B) também era plana no ACMR das Lychnophorinae e a aquisição de margem revoluta aconteceu independentemente seis vezes, em quatro táxons bem delimitados (*Lychnophora* s. str., *Paralychnophora* e *Chronopappus*) além de presente no clado *L. regis* + *L. triflora* (de 'Bahian *Lychnophora*'),

em parte do clado da Aliança *Prestelia* (com uma reversão em *L. tomentosa*), na espécie *Piptolepis* sp. ined., e no grupo externo *Piptocarpha* (Fig. 15B).

A dimensão da nervura central em relação ao mesofilo apresenta uma ambiguidade quanto ao estado no ACMR das Lychnophorinae; se for considerada a hipótese em que o estado "nervura central volumosa" aparece no ACMR, este teria se mantido por sete táxons bem delimitados (Fig. 15C), ocorrendo reversão uma vez para todo o restante da subtribo (a partir do ancestral comum de *Minasia* e das outras linhagens "derivadas") e outras duas vezes para táxons distintos (uma para todo o grupo Aliança *Prestelia* e outra para *Blanchetia*). Se for considerada a presença de nervura central não volumosa no ACMR, existem duas hipóteses. Na primeira as folhas com nervura central volumosa teriam surgido duas vezes, uma em *Gorceixia* e a outra no ancestral de *Anteremanthus* e das linhagens seguintes, sendo perdida no ancestral de *Minasia* e das linhagens subsequentes. Na segunda hipótese, teriam ocorrido três aquisições para folhas com nervura central volumosa, duas delas independentemente (*Gorceixia* e *Eremanthus leucodendron*) e uma sendo compartilhada por cinco táxons (a partir do ancestral de *Anteremanthus*), sendo revertida uma única vez para o restante da subtribo.

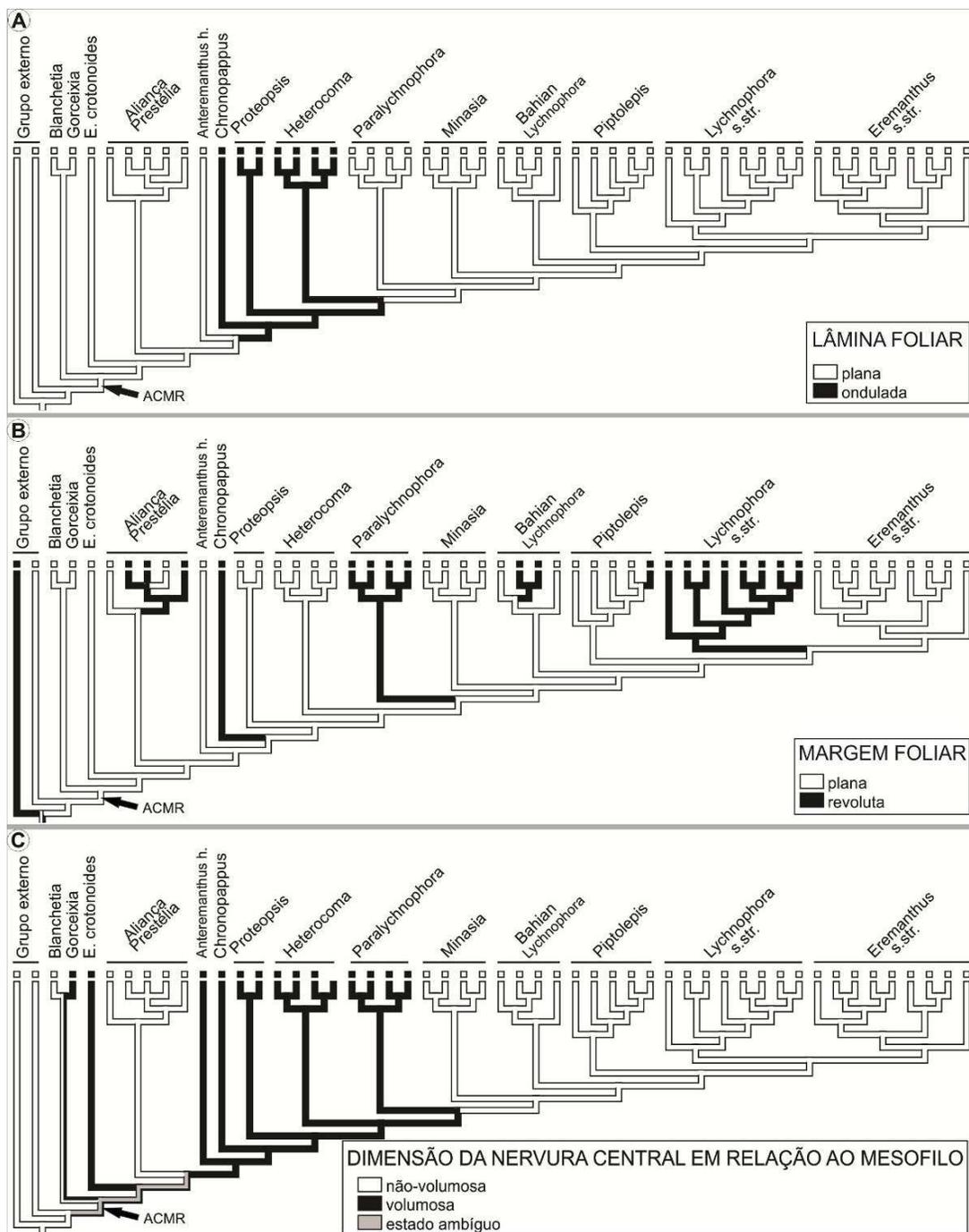


Fig. 15. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter (parcimônia) de: A. Lâmina foliar. B. Margem foliar. C. Dimensão da nervura central em relação ao mesofilo. Ramos em ‘preto e branco’ = estado de caracter indefinido ou ambíguo no ancestral do clado. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

Para o contorno da nervura central (Fig. 16A) existem cinco estados de carácter (A, B, C, D e E), exemplificados na descrição morfoanatômica das formas da folha (Fig. 6). As reconstruções indicam ambiguidade para o estado do ACMR das *Lychnophorinae*, podendo ter apresentado o contorno da nervura central do tipo A ou do tipo B. A maioria das MPRs indicou que o tipo B estava presente no ACMR. Quando se considera essa hipótese, teriam acontecido dez aquisições para os demais estados (tipos A, C, D e E) e uma reversão para o tipo B. Quando se considera que o ACMR tinha o contorno da nervura central do tipo A, teriam ocorrido oito aquisições para os demais estados e três reversões. Apesar da ambiguidade quanto ao estado do ACMR e também de alguns nós basais, os padrões de contorno da nervura central são muito informativos, pois distinguem bem os táxons para toda a subtribo (Fig. 16A), ocorrendo apenas uma reversão dentro do clado *Paralychnophora* e duas em *Eremanthus*, onde *Lychnophora syncephala* apresenta o mesmo tipo de contorno da nervura central do clado *Lychnophora* s. str. (tipo C) e *E. glomerulatus*, apresenta o contorno da nervura central do tipo A.

Para o arranjo múltiplo dos feixes vasculares na nervura central as reconstruções indicam duas hipóteses: que o carácter teria surgido no ancestral do clado *Paralychnophora* com uma reversão em *P. patriciana*, ou que o carácter teria surgido duas vezes no gênero *Paralychnophora*, uma no clado *P. bicolor* + *P. harley* e outra em *P. reflexoauriculata*. Se for considerada a primeira hipótese, o arranjo múltiplo dos feixes vasculares poderia se constituir em uma sinapomorfia para o gênero *Paralychnophora*, com uma reversão em *P. patriciana* (Fig. 16B).

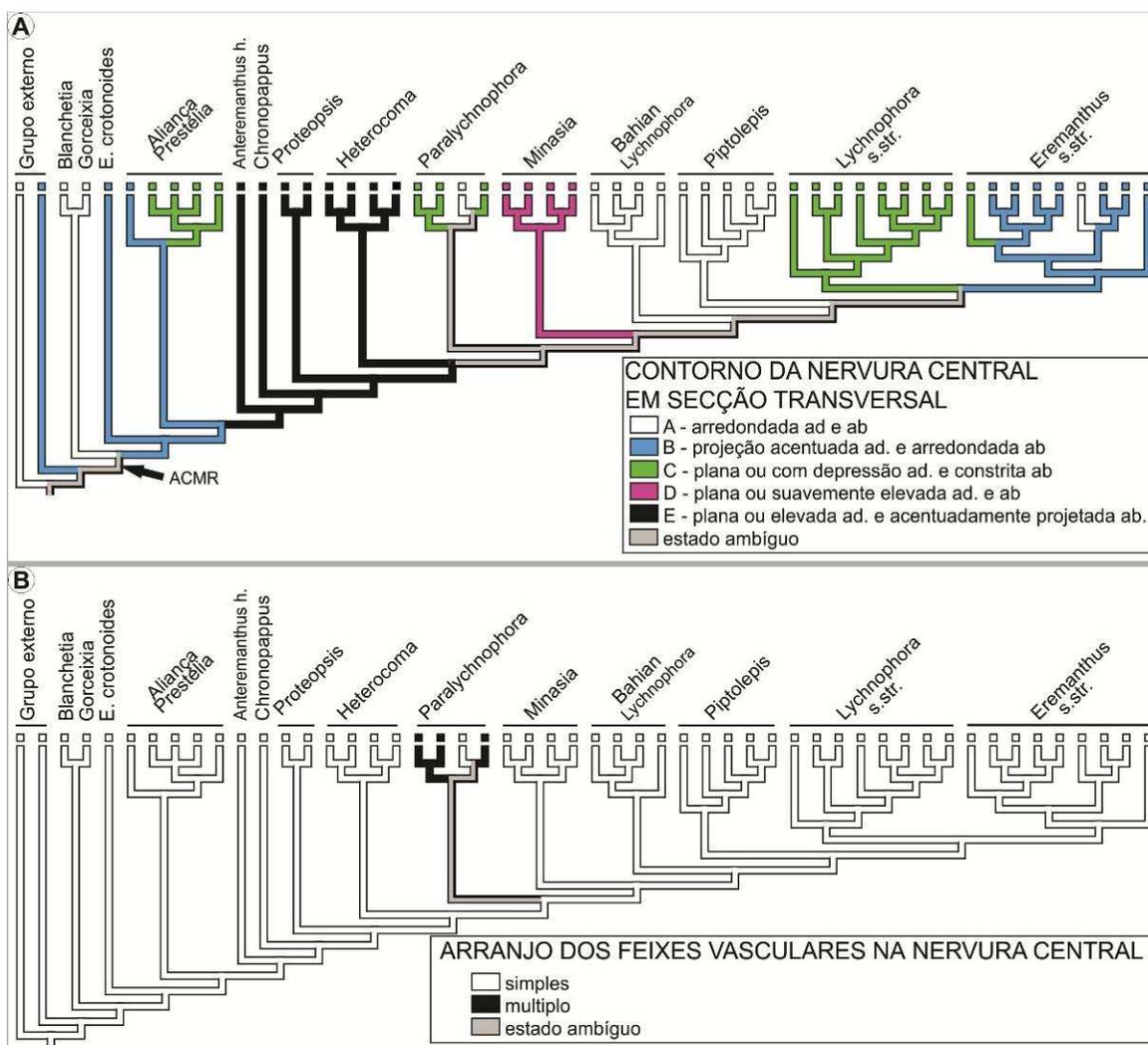


Fig. 16. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Contorno da nervura central em secção transversal. B. Arranjo dos feixes vasculares na cervura central. Em A ad = adaxialmente; ab = abaxialmente. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

Quando se compara a presença de esclereídes nas folhas com a presença de esclereídes nas porções terminais dos caules (Fig 17A), se observa que a ocorrência coincide para grande parte dos grupos, pois todas as linhagens que apresentam esclereídes nas terminações caulinares também apresentam folhas com esses tipos celulares. O ACMR das

Lychnophorinae pode ou não ter apresentado esclereídes na folha. A maioria das MPRs indica que as esclereídes estavam ausentes no ACMR. Além disso, a maioria das MPRs também indica que esse carácter teria surgido duas vezes em Lychnophorinae, basalmente em *Gorceixia* e posteriormente, no ancestral da Aliança *Prestelia* e das linhagens subsequentes.

A presença de esclereídes na folha é bastante comum para a subtribo, sendo que a ausência é característica de quatro linhagens distintas (*Heterocoma*, *Chronopappus*, *Eremanthus crotonoides* e *Blanchetia*), de um clado de *Eremanthus* s. str. (*E. arboreus* + *E. capitatus* + *E. erythropappus* + *E. polycephalus*) e, esporadicamente o estado é ausente em outros três clados. Em Lychnophorinae as esclereídes ocorrem muitas vezes associadas às extensões de bainha dos feixes. Quando se compara a presença de esclereídes na folha com a presença de extensões da bainha do feixe observa-se a correspondência para muitos grupos (Fig. 17B).

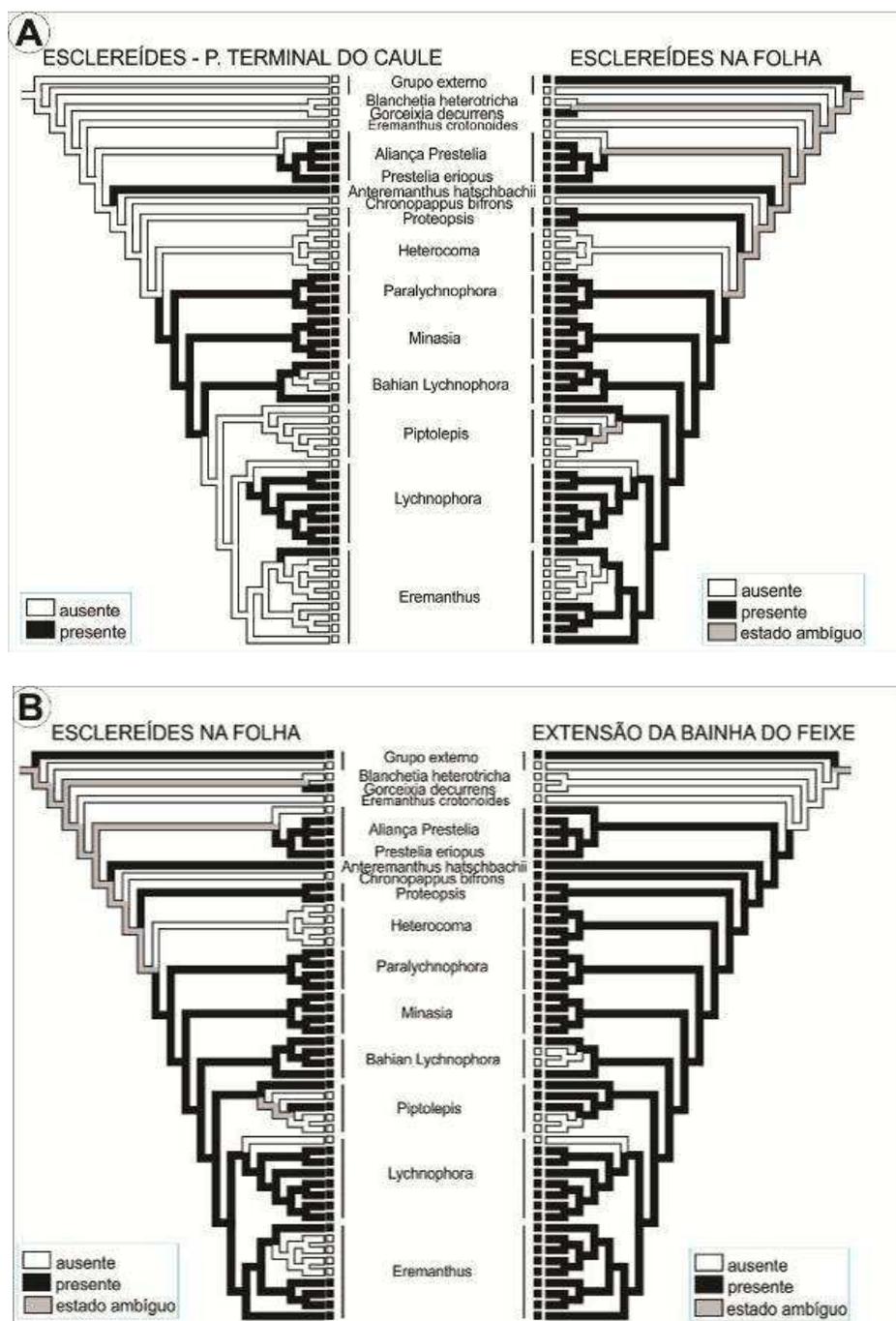


Fig. 17. Cladogramas em espelho de: A. Esclereídes na porção terminal do caule e esclereídes na folha. B. Esclereídes na folha e extensões de bainha dos feixes na folha.

As reconstruções indicam que o ACMR das Lychnophorinae não apresentava criptas nas folhas. As MPRs indicam duas hipóteses, na primeira, as criptas teriam sido adquiridas sete vezes sem nenhuma perda, caracterizando quatro linhagens (Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Proteopsis* e *Paralychnophora*), sendo frequente em *Lychnophora* s. str. e ocasional em *Heterocoma* (Fig. 18A). Na segunda hipótese, teriam ocorrido seis aquisições, caracterizando as mesmas linhagens e também *Lychnophora* s. str. (com duas perdas em *L. pinaster* e *L. granmogolensis*) e uma aquisição em *Heterocoma albida*.

Em relação à cutícula espessa na face adaxial da folha (Fig. 18B), as reconstruções indicam que essa não estava presente nas folhas do ACMR. As ambiguidades nos nós mais próximos das raízes das linhagens indicam diferentes hipóteses sobre a aquisição do estado, podendo ter ocorrido de duas a cinco vezes. Contudo é possível notar que a presença de cutícula espessa na face adaxial da folha caracteriza seis linhagens distintas de Lychnophorinae (Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Paralychnophora*, ‘Bahian *Lychnophora*’, *Lychnophora* s. str. e *Eremanthus* s. str.) com apenas uma perda para um clado dentro de *Eremanthus* (*E. glomerulatus* + *E. incanus* + *E. argenteus*).

A presença de cloroplastos conspícuos na epiderme foliar coincide amplamente com a ocorrência de cloroplastos conspícuos na epiderme caulinar (Fig. 19A). Além disso, como no caule, a ocorrência de cloroplastos na epiderme da folha, coincide com a ocorrência de indumento conspícuo na folha (Fig. 19B). A presença ou a ausência de cloroplastos conspícuos na epiderme foliar do ACMR das Lychnophorinae é indefinida (Fig. 19A), mas a maioria das MPRs indica que estava ausente no ACMR. Há ambiguidade também em nós mais próximos das raízes das linhagens e portanto o número de aquisições é variável de acordo com as hipóteses. O carácter é comumente distribuído na subtribo e a sua ausência

parece mais informativa do que a presença, delimitando as linhagens *Eremanthus* s. str., 'Bahian *Lychnophora*', *Minasia*, *Anteremanthus* e *E. crotonoides*; além disso, três perdas pontuais teriam ocorrido em espécies de *Lychnophora* s. str. (*L. granmogolensis*), *Heterocoma* (*H. ekmaniana*) e Aliança *Prestelia* (*L. sellowii*).

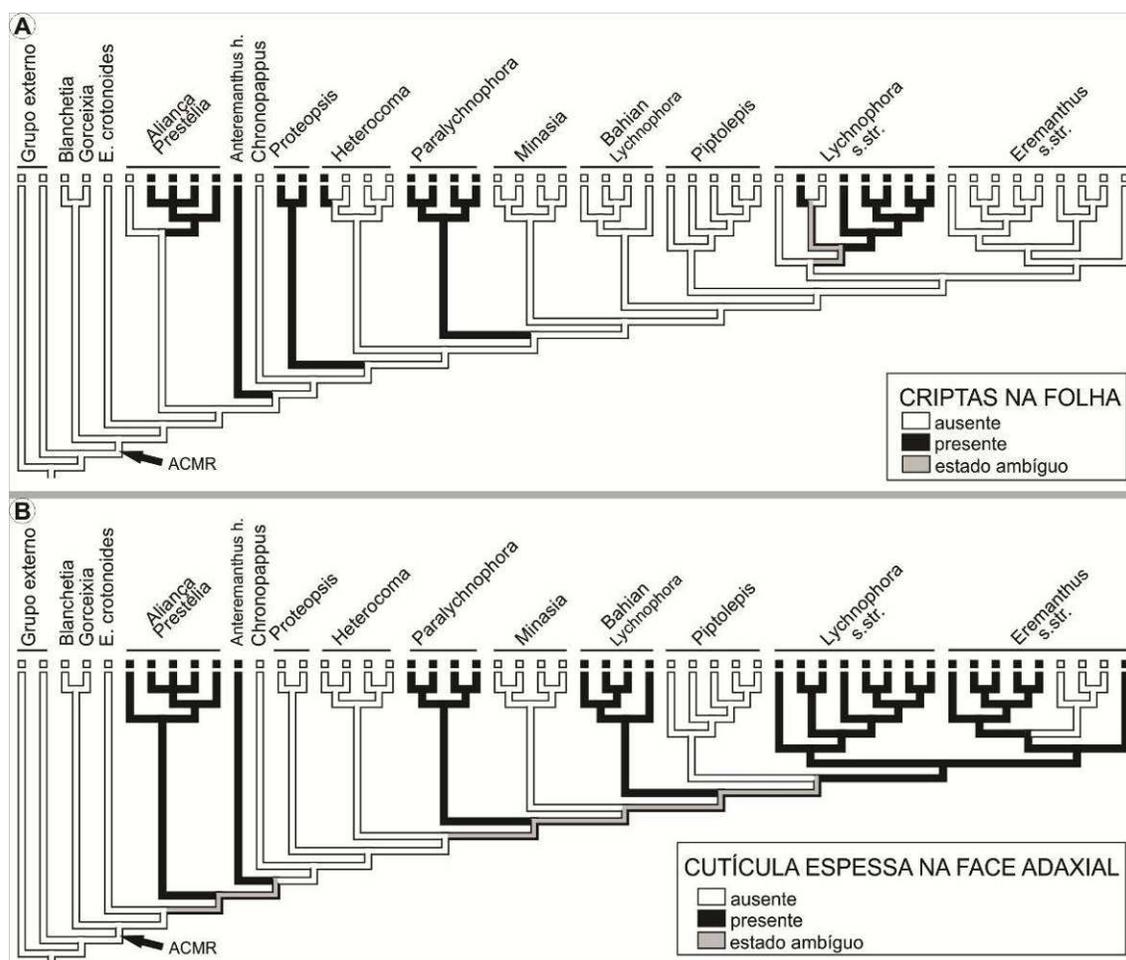


Fig. 18. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Presença de criptas na folha. B. Cutícula espessa na face adaxial. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

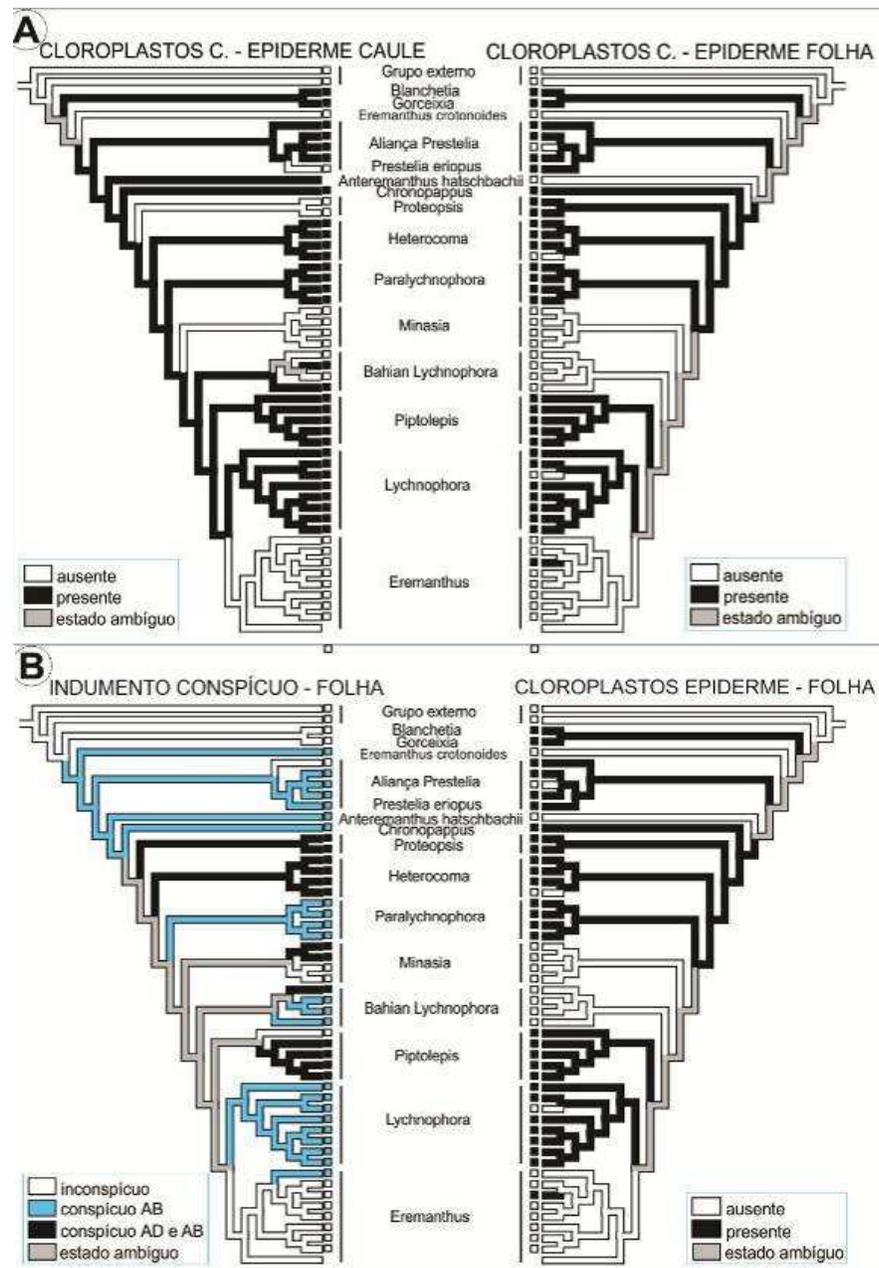


Fig. 19. Cladogramas em espelho de: A. Presença de cloroplastos conspícuos (C) na epiderme do caule e da folha; B. Indumento conspícuo na folha e presença de cloroplastos na epiderme da folha.

Ainda, em relação à epiderme, o carácter epiderme esporadicamente bisseriada é uma possível sinapomorfia para o género *Paralychnophora* (Fig. 20A).

Em relação a ocorrência de estômatos na folha, as reconstruções indicam que o ACMR das Lychnophorinae apresentava folhas com estômatos apenas na face abaxial (Fig. 20B). A presença de ambiguidades nos nós mais próximos das raízes das linhagens que apresentam estômatos em ambas as faces da folha, indica que os mesmos podem ter surgido de uma a três vezes, sem nenhuma perda. Apesar da ambiguidade, esse estado delimita três gêneros (*Proteopsis*, *Heterocoma* e *Minasia*), estando presentes também no grupo externo *Chresta*.

O indumento está sempre presente nas folhas de Lychnophorinae. Na folha adulta ou completamente expandida, o indumento pode estar presente na face abaxial ou presente em ambas as faces (Fig. 21). O estado do indumento na folha adulta no ACMR da subtribo é ambíguo. Quando se considera que esse apresentava indumento somente na face abaxial, a ocorrência em ambas as faces teria surgido duas vezes, uma para o grupo “basal” *Blanchetia* + *Gorceixia* e outra para o ancestral de *Chronopappus* e das linhagens subsequentes, ocorrendo três reversões. Se for considerado que o ACMR possuía indumento em ambas as faces, pode ter ocorrido reversão para ocorrência na face abaxial quatro vezes e uma aquisição secundária. Apesar da ambiguidade quanto ao estado do ACMR, os grupos taxonômicos são bem definidos pela presença de indumento em ambas as faces ou apenas na face abaxial (Fig. 21); a ocorrência de indumento apenas na face abaxial caracteriza as linhagens *E. crotonoides*, Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Paralychnophora*, os grupos mais “derivados” (*Eremanthus* s. str. e *Lychnophora* s. str.) assim como o grupo externo

Piptocarpha; além disso, caracteriza o clado *Lychnophora regis* + *L. triflora* dentro do grupo 'Bahian *Lychnophora*'. A presença de indumento em ambas as faces da folha caracteriza os demais grupos (Fig. 21).

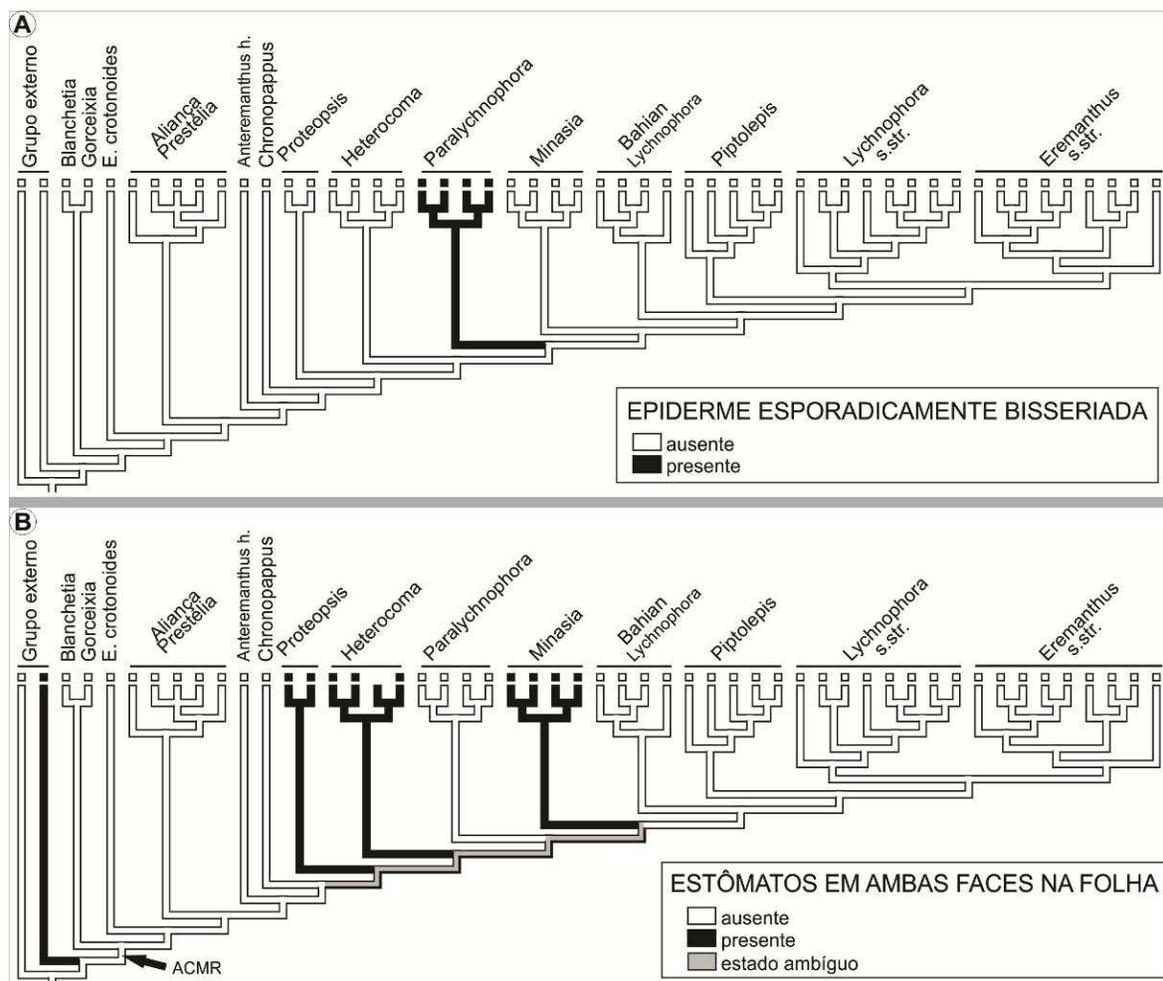


Fig. 20. Reconstrução dos estados ancestrais de caracter (parcimônia) de: A. Epiderme esporadicamente biseriada. B. Estômatos em ambas as faces na folha. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

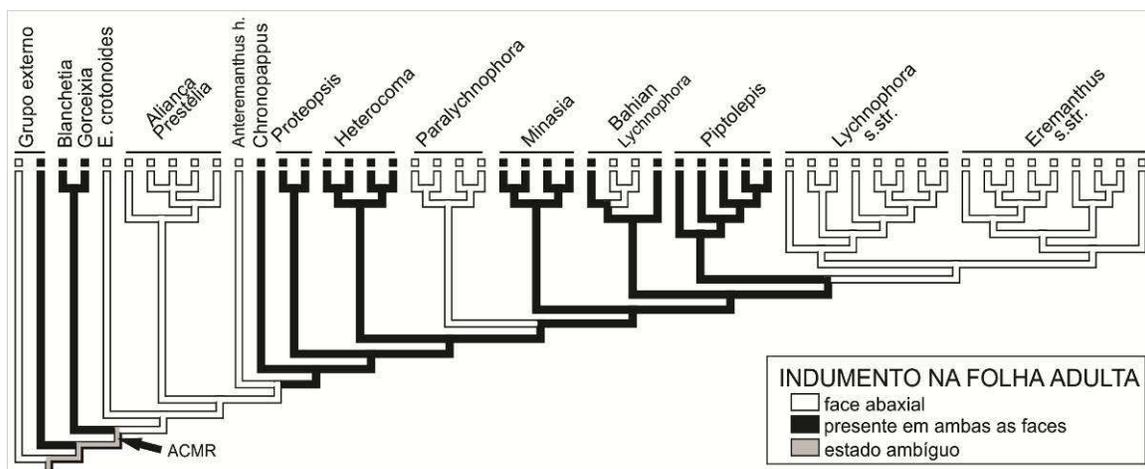


Fig. 21. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) da distribuição do indumento na folha adulta. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

Além disso, o indumento pode ser conspícuo (alto e denso) somente na face abaxial ou em ambas as faces, ou pode ser inconspícuo. As reconstruções indicam que o ACMR apresentava indumento inconspícuo (Fig. 22). Quanto a ocorrência de indumento conspícuo na face abaxial, as ambiguidades nos nós mais próximos das raízes das linhagens indicam diferentes hipóteses sobre a aquisição desse estado de carácter. Contudo a maioria das MPRs indica que o estado teria duas aquisições, uma vez no ancestral de *Eremanthus crotonoides*, estando presente daí em diante até a reversão no ancestral de *Eremanthus s. str.* e a segunda vez, ocorrendo uma aquisição secundária em *L. syncephala*). Além de *Eremanthus s. str.*, ocorreram outras três reversões para indumento inconspícuo (*Hololepis* do clado Aliança *Prestelia*; o clado *Minasia cabralensis* + *M. ramosa*; e em *E. pabstii* do clado *Piptolepis*).

Para o estado de ocorrência de indumento conspícuo em ambas as faces, há ambiguidade também em nós mais próximos das raízes das linhagens e portanto o número de

aquisições é variável. Contudo, a maioria das MPRs indica que o estado teria sido adquirido quatro vezes independentemente, e sem nenhuma perda (no ancestral de *Proteopsis* e *Heterocoma*, em *Minasia alpestris* + *M. scapigera*; no gênero *Piptolepis*; e na espécie *Eremanthus leucodendron*). Esse carácter é bastante informativo, pois os três estados de caracteres delimitam bem os táxons (Fig. 22).

A presença de tricomas glandulares é comum para toda a subtribo; as reconstruções indicam que a sua distribuição era restrita à face abaxial nas folhas do ACMR das Lychnophorinae, assim como nos grupos externos (Fig. 22). Esse estado permaneceu em diversos táxons da subtribo, com modificação para ocorrência em ambas as faces no grupo “basal” *Blanchetia* + *Gorceixia*. As ambiguidades nos nós mais próximos das raízes das linhagens subsequentes ao ancestral de *Chronopappus bifrons* indicam diferentes hipóteses sobre a aquisição desse estado carácter. De modo geral, a ocorrência em ambas as faces caracteriza *Minasia* e *Eremanthus* s. str. e é esporádica em outros grupos. Além disso, o gênero *Piptolepis* e a espécie *Lychnophora santosii* apresentam distribuição dos tricomas glandulares restrita à face adaxial.

Quando se compara a distribuição dos tricomas glandulares com a ocorrência de indumento conspícuo na folha adulta (Fig. 22) percebe-se que as espécies cujos tricomas glandulares ocorrem na face abaxial da folha, geralmente apresentam indumento conspícuo apenas na face abaxial.

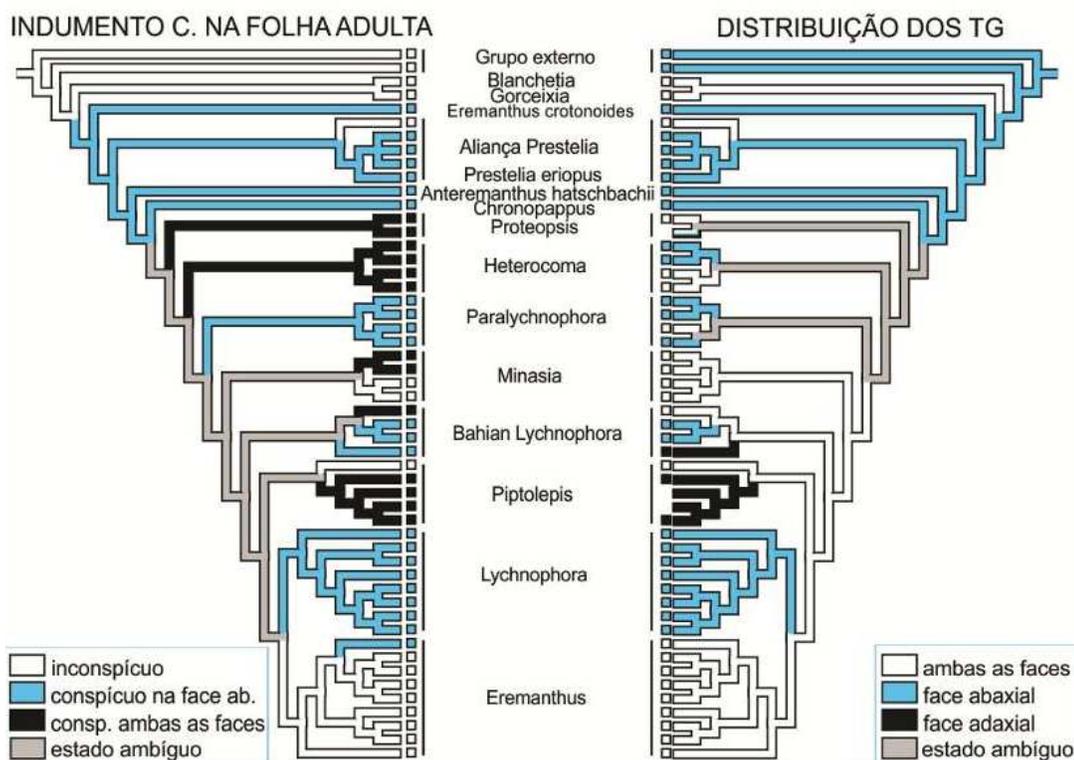


Fig. 22. Cladogramas em espelho representando a reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) da presença de indumento conspicuo (C) na folha adulta e da distribuição dos tricomas glandulares (TG) na folha. ab = abaxialmente.

Além da distribuição dos tricomas glandulares, a sua ocorrência em depressões epidérmicas na face adaxial (Fig. 23A) também é informativa, pois caracteriza dois clados (*Minasia* e *Eremanthus* s. str.) sem perdas, ocorrendo esporadicamente outras três vezes, em *Lychnophora santosii*, *Paralychnophora patriciana* e *Hololepis pedunculata*.

A simetria do mesofilo na maioria das espécies de Lychnophorinae é bifacial, no entanto, unicamente no gênero *Minasia* o estado do carácter é isofacial, o que o torna uma possível sinapomorfia para esse gênero (Fig. 23B).

Em relação à espessura do mesofilo (Fig. 23C), o ACMR das Lychnophorinae, assim como a maior parte da subtribo, apresentava mesofilo delgado. As reconstruções indicam

duas hipóteses: na MPR1 a presença de mesofilo espessado teria surgido quatro vezes para as linhagens Aliança *Prestelia* (exceto *Hololepis*), *Anteremanthus*, e *Paralychnophora* e para *Lychnophora diamantinana* + *L. ericoides* + *L. gardneri*, dentro do clado *Lychnophora* s. str.. Na MPR2, a diferença está no clado *Lychnophora* s. str., onde a presença de mesofilo espessado teria ocorrido duas vezes independentemente, uma em *Lychnophora diamantinana* e outra em *L. ericoides* + *L. gardneri* (Fig. 23C).

Para a ocorrência de hipoderme nas folhas, as reconstruções indicam que no ACMR das Lychnophorinae a mesma era ausente (Fig. 24A). A hipoderme teria surgido quatro vezes independentemente, sem nenhuma perda. A presença de hipoderme é bastante informativa, ocorrendo apenas em *Paralychnophora*, *Anteremanthus* e no clado de espécies do gênero *Lychnophora* pertencentes à Aliança *Prestelia*, além disso, ocorre isoladamente em *Heterocoma ekmaniana*.

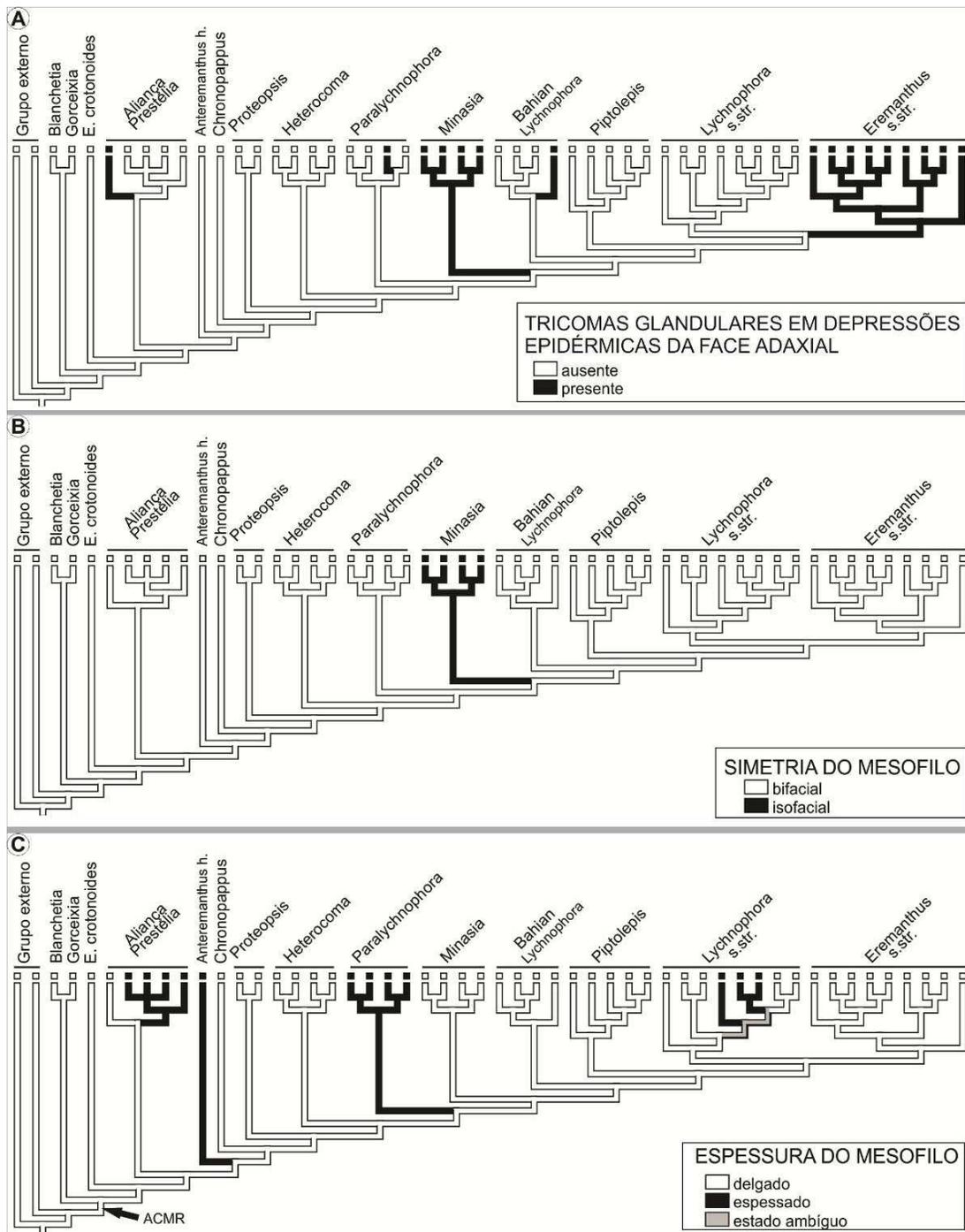


Fig. 23. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Tricomas glandulares em depressões epidérmicas da face adaxial. B. Simetria do mesofilo. C. Espessura do mesofilo. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

Ainda em relação ao mesofilo, a presença de parênquima incolor na região mediana do mesmo (Fig. 24B) tem grande valor informativo, pois possui ocorrência restrita ao gênero *Minasia*, constituindo uma possível sinapomorfia para essa linhagem.

A maioria das espécies de Lychnophorinae apresentam numerosos feixes vasculares ao longo do mesofilo (Fig. 24C), embora esse caracter estivesse ausente no ACMR da subtribo. As reconstruções indicam que o estado teria sido adquirido uma única vez. Como há ambiguidade em alguns ramos, existem diferentes hipóteses para o número de perdas, mas a maioria das MPRs indica que o estado teria sido perdido 10 vezes. A sua ausência define quatro linhagens: clado *Blanchetia* + *Gorceixia*, *Eremanthus crotonoides*, *Chronopappus*, *Piptolepis* e *Heterocoma* (exceto *H. albida*), assim como algumas espécies de *Eremanthus* s. str. (*E. glomerulatus*, *E. incanus* e clado *E. arboreus* + *E. capitatus*) e de *Lychnophora* s. str. (*L. gardneri* e *L. granmogolensis*).

Sobre as extensões de bainha do feixe, as reconstruções indicam que essas estruturas não estavam presentes no ACMR da subtribo (Fig. 25A). Essas extensões foram adquiridas uma vez no ancestral do clado Aliança *Prestelia* e de todas as linhagens "derivadas" de Lychnophorinae com apenas três perdas (clado *Lychnophora regis* + *L. triflora*; clado *Piptolepis ericoides* + *Piptolepis* sp. ined. e em *Lychnophora pinaster*), o que pode indicar uma possível sinapomorfia para esse clado.

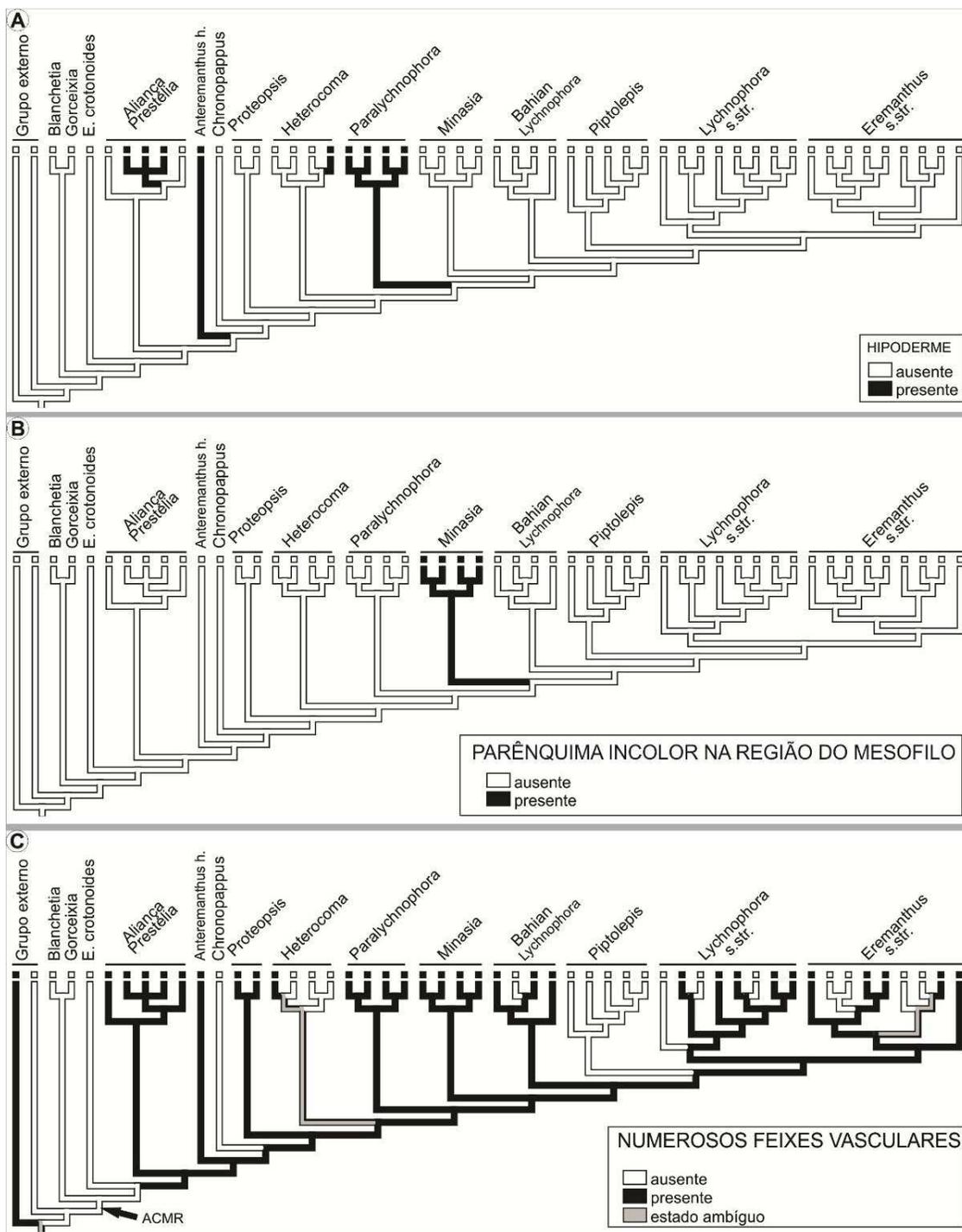


Fig. 24. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Hipoderme na folha. B. Presença de parênquima incolor na região do mesofilo. C. Presença de numerosos feixes vasculares na folha. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

A caracterização das extensões de bainha (Fig. 25B) em relação à natureza das células é mista (parenquimatosa, colenquimatosa e esclerenquimatosa) na maioria dos grupos, sendo que a ocorrência de bainhas com natureza exclusivamente esclerenquimatosa surgiu três vezes, pontualmente em espécies do gênero *Eremanthus* nos clados *Eremanthus* s. str. (*E. mattogossensis*), *Piptolepis* (*E. pabstii*) e ‘Bahian *Lychnophora*’ (*E. leucodendron*).

Para a localização do parênquima clorofiliano (Fig. 25C) as reconstruções indicam que o ACMR das *Lychnophorinae* apresentava o parênquima clorofiliano distribuído ao longo de todo o mesofilo (Fig. 25C). As ambiguidades nos nós mais próximos das raízes das linhagens e em alguns clados indicam diferentes hipóteses sobre a aquisição dos estados do carácter. Apesar disso, algumas linhagens são caracterizadas pelos seguintes estados: a localização do parênquima clorofiliano ao longo do mesofilo é visualizada no clado “basal” *Blanchetia* + *Gorceixia*, nas linhagens *Eremanthus crotonoides*, *Chronopappus bifrons*, *Eremanthus* s. str. e em algumas espécies isoladamente. A localização entre extensões de bainha conspícuas caracteriza *Prestelia eriopus*, *Proteopsis*, *Heterocoma* (exceto *H. ekmaniana*), e a maior parte do clado *Lychnophora* s. str., além de algumas ocorrências isoladas. O estado "entre a hipoderme e as extensões de bainha dos feixes" caracteriza as espécies de *Lychnophora* da Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus* e *Paralychnophora*. Por fim, a localização do parênquima clorofiliano restrito a setores adjacentes aos estômatos é uma possível sinapomorfia para *Minasia* (Fig. 25C).

A figura 26 sintetiza as prováveis sinapomorfias morfoanatômicas de caracteres foliares observados na subtribo *Lychnophorinae*.

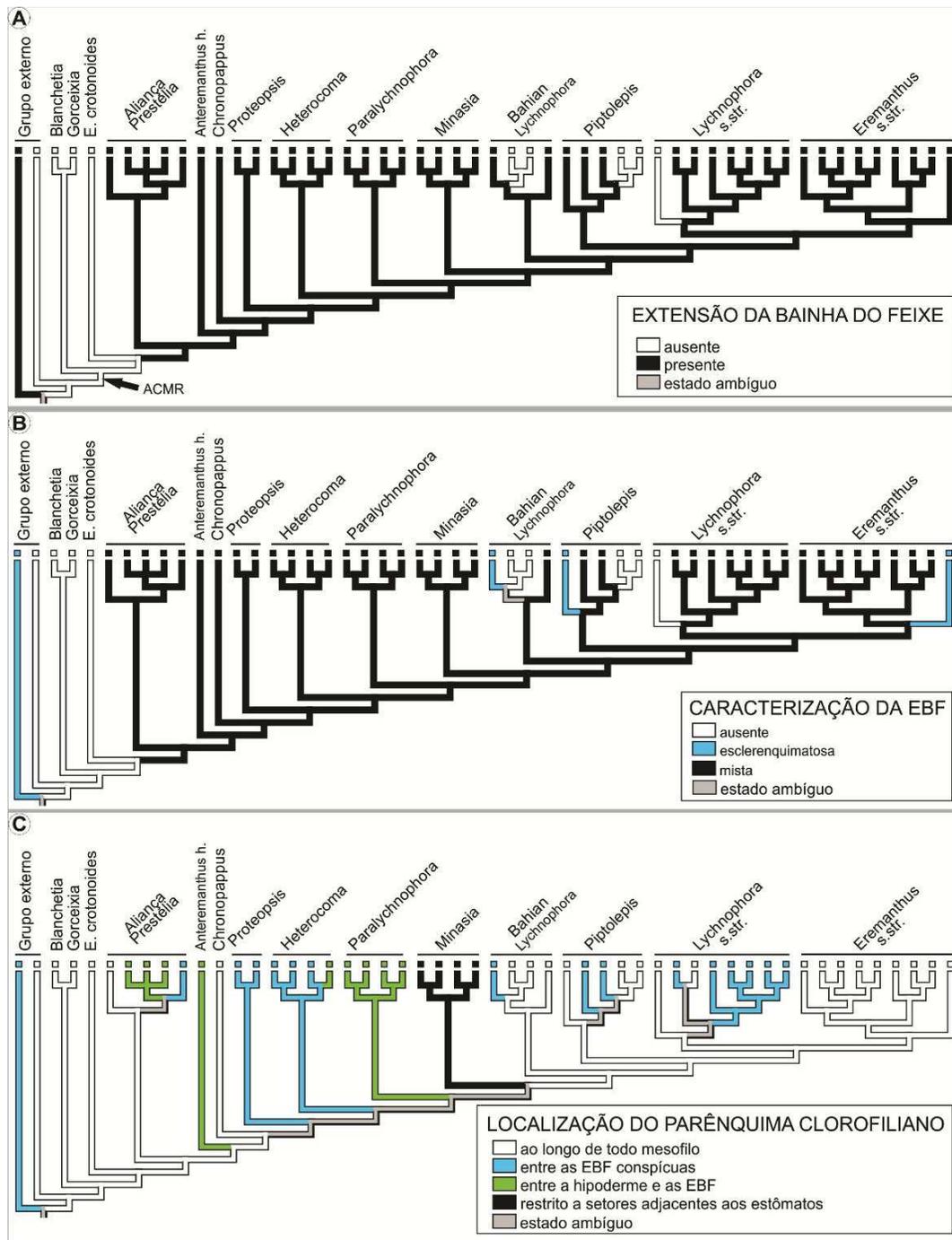


Fig. 25. Reconstrução dos estados ancestrais de carácter (parcimônia) de: A. Presença de extensão da bainha do feixe. B. Caracterização da extensão da bainha do feixe (EBF) em relação à natureza da parede das células. C. Localização do parênquima clorofiliano. Mista = parenquimatosa, colenquimatosa e esclerenquimatosa. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

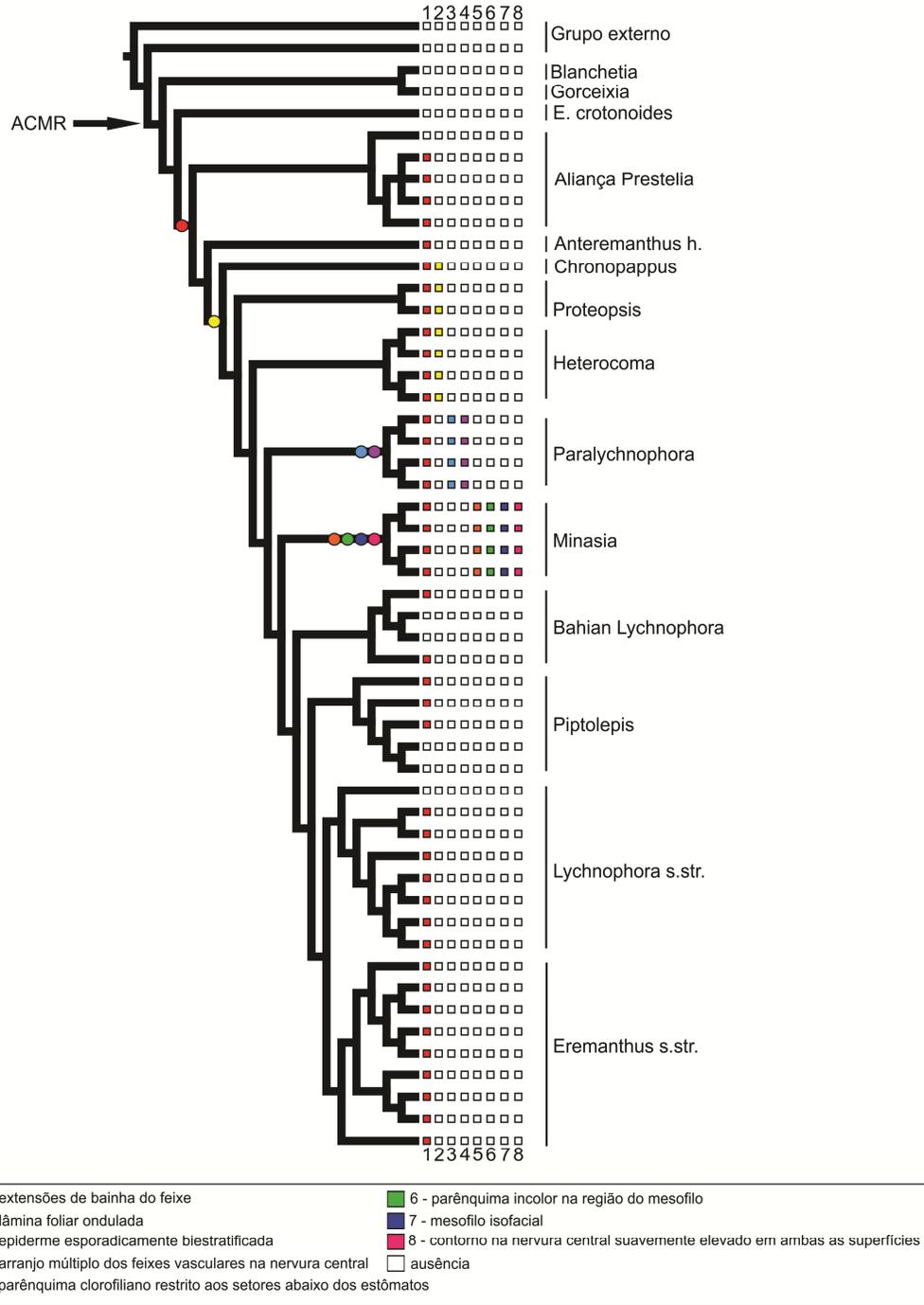


Fig. 26. Representação das sinapomorfias morfoanatômicas observadas sobre caracteres foliares de Lychnophorinae. Os caracteres são representados por quadrados de diferentes cores (presença do estado). Esferas representam o surgimento do estado de carácter no ancestral comum do clado. ACMR = ancestral comum mais recente das Lychnophorinae.

DISCUSSÃO

Morfologia e anatomia dos caules e folhas

Neste estudo observaram-se dois diferentes tipos caulinares baseados na morfologia e na anatomia, os quais são, por sua vez, relacionados ao tipo de hábito: o tipo 1, das plantas caulirosuladas e o tipo 2, dos demais hábitos - arbustos, subarbustos, árvores e arvoretas. O tipo de sistema caulinar observado nas plantas caulirosuladas foi descrito pela primeira vez por Cuatrecasas (1933) para as espécies de Espeletiinae (Heliantheae) e é explicado com detalhes recentemente em Cuatrecasas (2013). O desenvolvimento das porções apicais dos caules de espécies caulirosuladas descrito em Cuatrecasas (2013) é muito semelhante àquele observado neste trabalho, com a presença de um espessamento primário apical resultante do meristema medular, em grande parte idêntico ao observado em Lychnophorinae.

O valor adaptativo deste tipo de hábito foi amplamente investigado em *Espeletia* (Baruch, 1979; Baruch e Smith, 1979), *Neblinaria* (Givnish *et al.*, 1986) e em diversas espécies alpinas (Smith e Young, 1987). Os autores sugerem que esse tipo particular de hábito é favorecido contra flutuações ambientais extremas (na proteção das gemas terminais e das folhas jovens contra a radiação UV, no isolamento das porções meristemáticas contra o fogo e o frio, e no aumento da retenção de água pelas partes senescentes das folhas aderidas ao caule). Condições de alta radiação UV, de escassez de água e de ocorrência de fogo são comuns nos *campos rupestres* em que habitam as espécies caulirosuladas de Lychnophorinae e as características presentes nesse grupo de plantas indicam que, entre as espécies da subtribo, as mesmas são as mais adaptadas às condições desses ambientes (Lusa *et al.*, 2014).

Além disso, observou-se que as espécies caulirosuladas parecem ocupar um nicho específico nos *campos rupestres*, pois ocorrem exclusivamente entre as altitudes de 900 a 1500 metros (Loeuille, 2011), onde as condições citadas acima são ainda mais extremas, assemelhando-se, em parte, às condições ambientais que estão sujeitas as espécies alpinas (Baruch, 1979; Baruch e Smith, 1979; Givnish *et al.*, 1986; Smith e Young, 1987).

Apesar dos hábitos distintos, os caules do tipo 2 apresentam uma série de características semelhantes entre si. A epiderme é uniestratificada e de modo geral, apresenta denso indumento, sendo nesse caso, constituída na sua maior parte, pelas células basais dos tricomas; o córtex é relativamente pouco extenso e a medula é ampla, assim como observado nas espécies caulirosuladas. Características caulinares semelhantes foram observadas por Luque e Menezes (2003) para espécies de *Lychnophora* sensu lato.

As folhas de *Lychnophorinae* exibem um número muito grande de variações morfoanatômicas que refletem caracteres distintos entre as linhagens de *Lychnophorinae*. Luque *et al.* (1999) realizaram um estudo sobre anatomia foliar de *Lychnophora* sensu lato abordando seis gêneros, dos 18 atualmente reconhecidos para a subtribo *Lychnophorinae* (Loeuille 2011). Nos seus estudos Luque *et al.* (1999) indicaram caracteres possivelmente úteis para separação dos grupos taxonômicos: características epidérmicas, estratificação do parênquima clorofiliano, simetria do mesófilo, ocorrência de parênquima aquífero, feixes vasculares na nervura central e ocorrência de criptas. Com relação à presença de parênquima aquífero, Luque *et al.* (1999) descrevem que este é hipodérmico; além disso, os autores descrevem a participação das extensões de bainhas no parênquima aquífero. Embora no presente estudo não se nomeie um parênquima aquífero, concorda-se que a hipoderme e as extensões de bainha colenquimatosas possam desempenhar a função de retenção de água.

Essa hipótese foi sugerida nesse estudo pela verificação de espessamento parietal de natureza péctica nesses tecidos, e previamente apontada em Lusa *et al.* (2014). No entanto, nesse estudo prefere-se denominar separadamente a hipoderme e as extensões de bainha, pois são estruturalmente distintas e tem ocorrência também distinta nos grupos taxonômicos. Além disso, a epiderme representada por células altas ou volumosas em alguns grupos, geralmente apresenta espessamento parietal de natureza péctica, assim como o parênquima incolor na região mediana do mesofilo, característico de *Minasia*, sugerindo que esses tecidos também possuam a função de retenção de água. As células epidérmicas altas ou volumosas e o parênquima incolor na região do mesofilo estão sempre presente em grupos que não apresentam hipoderme, o que sugere mais uma vez que, nesses casos, esses tecidos poderiam ter função análoga à hipoderme e às extensões de bainha dos feixes na retenção de água.

Mapeamento dos caracteres morfológicos e anatômicos na filogenia de Lychnophorinae

Caule

Alguns caracteres, relativos ao eixo caulinar e ao espessamento apical medular e cortical e à cobertura do caule, estão diretamente relacionados ao hábito caulirosulado, ou seja, as aquisições foram realizadas nos grupos representados pelos gêneros *Prestelia*, *Proteopsis* e *Minasia*, como convergência adaptativa. Além disso, observou-se que os grupos de espécies não caulirosuladas que apresentam tricomas e folhas marcescentes ou partes destas na cobertura subapical são os mais próximos filogeneticamente dos grupos caulirosulados (que apresentam apenas folhas senescentes ou partes destas, sem tricomas). De acordo com a hipótese filogenética atual de Lychnophorinae (Loeuille 2011), a evolução

do hábito ocorreu de forma independente, ou seja, as diferentes formas de vida teriam surgido várias vezes. Dessa maneira, sugere-se a hipótese de que a especialização da cobertura, representada pela permanência de folhas ou de suas partes sobre as porções subapicais dos caules, poderia ter sido anterior à redução do hábito caulirosula.

Ainda, a presença de folhas sobrepostas na porção apical dos caules ocorreu em grande parte nos mesmos grupos que apresentam folhas marcescentes ou partes destas sobre a porção subapical, reforçando a ideia de uma especialização para proteção de toda a superfície caulinar nesses grupos. É conhecido que as folhas sobrepostas e as folhas marcescentes atuam na proteção do caule contra danos externos, como o fogo e auxiliam na absorção de água e no consequente isolamento térmico (Givnish *et al.*, 1986; Smith e Young, 1987). Além disso, também foi observado que a presença de entrenós muito reduzidos no caule está diretamente relacionada com a presença de folhas sobrepostas nos caules. Esse fato é corroborado pelas observações do desenvolvimento apical das espécies caulirosuladas, onde se observou que o encurtamento dos entrenós é decorrente da formação de primórdios foliares extremamente próximos.

Com relação à presença de cloroplastos conspícuos na epiderme caulinar, observou-se que esse carácter está presente em grande parte nos grupos que apresentam indumento muito conspícuo no caule. Skelton *et al.* (2012) registraram que, em Proteaceae, a pilosidade foliar não é uma adaptação xérica, pois não reduz a perda de água por transpiração, mas tem um papel importante na proteção contra a radiação solar, atuando na reflectância da luz e reduzindo a absorção do excesso de luz e a temperatura foliar. Isso sugere que a ocorrência de cloroplastos na epiderme caulinar em Lychnophorinae tenha conferido vantagens aos grupos que possuem indumento muito denso, pois este possivelmente reduz a chegada de luz

aos tecidos do parênquima cortical. Assim, a presença de cloroplastos na epiderme contrabalancearia a reflexão da radiação solar pelo indumento.

Além das relações observadas entre os caracteres do caule e daqueles citados acima como diagnósticos para os grupos de plantas caulirosuladas, o mapeamento de todos os caracteres caulinares na filogenia indicou aqueles que apresentam maior valor informativo para distinguir os gêneros em Lychnophorinae: cobertura da porção subapical do caule; estômatos elevados no caule; feixes vasculares salientes na superfície; esclereídes com diferentes dimensões entre os tecidos; endoderme secretora; e epiderme remanescente sobre ramos lenhosos. Os demais caracteres também são informativos, mas em alguns casos, a sua ausência é mais informativa que a presença.

Folha

Alguns caracteres relativos às folhas também apresentaram relações quando comparados entre si, assim como algumas relações foram observadas entre caracteres foliares e caulinares. Observou-se a presença de esclereídes nas folhas de todos os táxons que apresentam esclereídes nas porções terminais dos caules. O papel das esclereídes na proteção mecânica dos tecidos, através do aumento da resistência e rigidez dos mesmos é amplamente conhecido (Turner 1994) e provavelmente tenha grande importância nos ambientes em que as Lychnophorinae ocorrem, como já sinalizado por Lusa *et al.* (2014). Além disso, a ocorrência desses tipos celulares em folhas foi também associada com a distribuição de luz dentro do mesofilo para as células do parênquima clorofiliano (Bosabalidis e Kofidis 2002; Karabourniotis 1998). Em Lychnophorinae, as esclereídes geralmente ocorrem em tecidos

acolorofilados, como na hipoderme e nas extensões de bainha dos feixes e dessa forma, poderiam atuar na reflexão da luz solar que atravessa as células de grandes dimensões da epiderme adaxial ou as camadas celulares da hipoderme, conforme sugerem os autores acima. Levando em consideração essa hipótese, comparou-se a ocorrência de esclereídes nas folhas com a presença de extensões de bainha do feixe (mais comuns que a hipoderme) e constatou-se uma forte correspondência da ocorrência de ambos os caracteres entre os táxons. Essa verificação nos sugere que em *Lychnophorinae*, as esclereídes poderiam atuar tanto estruturalmente, como na distribuição de luz no mesófilo.

Como no caule, na folha também foi observada correspondência entre a ocorrência de cloroplastos conspícuos na epiderme foliar e a presença de indumento conspícuo, o que possivelmente confere vantagens no aproveitamento da luz, apesar da densa cobertura de tricomas. Embora em parte dos grupos que apresentam folha com indumento conspícuo essa cobertura ocorre somente na face abaxial, na folha completamente expandida (ou adulta) a quebra dos tricomas na face adaxial é posterior à expansão foliar, ou seja, as folhas jovens apresentam sempre indumento em ambas as faces e nesse caso, a presença de cloroplastos na epiderme pode ser vantajosa.

A presença de tricomas glandulares é comum para toda a subtribo. Nesse estudo observou-se que as espécies que apresentam tricomas glandulares apenas na face abaxial da folha, geralmente apresentam indumento conspícuo na mesma face, recobrando os tricomas glandulares dessas estruturas. Werker (2000) sugere que os tricomas com células alongadas, além de protegerem a planta de herbívoros, patógenos, luz excessiva, perda de água e altas temperaturas, também podem proteger tricomas glandulares mais curtos. Assim, de acordo

com as nossas observações, sugere-se que em Lychnophorinae o indumento possivelmente atue também na proteção dos tricomas glandulares.

As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres indicaram a ocorrência de provável convergência adaptativa - onde os mesmos estados teriam surgido algumas vezes independentemente - em diversos caracteres foliares: margem foliar revoluta, criptas, cutícula espessa na face adaxial, estômatos em ambas as faces da folha, indumento conspicuo em ambas as faces, presença de mesofilo espessado e hipoderme. As espécies que apresentam essas características habitam ambientes semelhantes ao longo dos *campos rupestres* e cerrados do Domínio Cerrado e, provavelmente, sofreram as mesmas pressões seletivas. De acordo com Giulietti *et al.* 1997, nesse ambiente, teria ocorrido convergência no hábito, nas características foliares e no imbricamento foliar entre formas de vida esclerófilas sempre verdes, pertencentes a diversas famílias, incluindo tanto eudicotiledôneas como monocotiledôneas (como Asteraceae, Ericaceae, Melastomataceae, Velloziaceae, Xyridaceae, Eriocaulaceae, entre outras).

Em relação às características morfoanatômicas, as informações obtidas nesse estudo sugerem que possivelmente existe convergência adaptativa (especialmente em relação as características foliares) nas espécies que habitam os *campos rupestres*, com características compartilhadas tanto com membros de outras tribos de Asteraceae, quanto com outras famílias. Como em Lychnophorinae, foram também observadas as seguintes características em famílias que habitam os *campos rupestres*:

- margens revolutas em Melastomataceae (Gardoni *et al.*, 2007);
- criptas em Velloziaceae (Mello-Silva, 1990);

- células epidérmicas de grandes dimensões em Eriocaulaceae e Melastomataceae (Scatena *et al.*, 2005; Gardoni *et al.*, 2007);
- mesofilo isofacial na tribo Mutisieae de Asteraceae e na família Xyridaceae (Melo-de-Pinna, 2004; Sajo *et al.*, 1995);
- esclereídes na tribo Mutisieae (Asteraceae) e em Eriocaulaceae (Melo-de-Pinna, 2004; Scatena *et al.*, 2005);
- extensões de bainha dos feixes na tribo Mutisieae, em Eriocaulaceae e em Velloziaceae (Melo-de-Pinna, 2004; Scatena *et al.*, 2005; Mello-Silva, 1990);
- hipoderme em Eriocaulaceae e Velloziaceae (Scatena *et al.*, 2005; Mello-Silva, 1990);
- e numerosos feixes vasculares em Eriocaulaceae, Velloziaceae e Xyridaceae (Scatena *et al.*, 2005; Mello-Silva, 1990; Sajo *et al.*, 1995).

Desse modo é possível notar que, apesar de as pressões seletivas serem praticamente as mesmas, pois todos esses indivíduos habitam os ambientes dos campos rupestres, nem todas as características são comuns para todos os táxons, e esse fato possivelmente reflete a individualidade genotípica dos mesmos.

Além das convergências adaptativas, as folhas de Lychnophorinae apresentam um grande número de caracteres que delimitam os táxons. São eles: forma da lâmina foliar em secção transversal; margem foliar; dimensão da nervura central em relação ao mesofilo; contorno da nervura central em secção transversal; arranjo dos feixes vasculares na nervura central; criptas nas folhas; células epidérmicas altas ou volumosas; cutícula espessa na face adaxial; epiderme esporadicamente bisseriada; estômatos em ambas as superfícies; tricomas glandulares em depressões epidérmicas na face adaxial; distribuição do indumento na folha

adultas; indumento conspicuo na folha adulta; simetria do mesofilo; espessura do mesofilo; hipoderme; parênquima incolor na região do mesofilo; e arranjo do parênquima clorofiliano.

Nas folhas também foram observadas possíveis sinapomorfias, tais como: lâmina foliar ondulada para o clado formado pelas linhagens *Chronopappus bifrons*, *Proteopsis* e *Heterocoma*; arranjo múltiplo dos feixes vasculares na nervura central e epiderme esporadicamente biestratificada para *Paralychnophora*; contorno na nervura central suavemente elevado em ambas as superfícies, mesofilo isofacial, parênquima incolor na região do mesofilo e parênquima clorofiliano restrito aos setores abaixo dos estômatos para *Minasia*; e a presença de extensões de bainha do feixe como sinapomorfia para o clado formado por Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Proteopsis*, *Heterocoma*, *Paralychnophora*, *Minasia*, ‘Bahian *Lychnophora*’, *Piptolepis*, *Lychnophora* s. str. e *Eremanthus* s. str..

Hipótese da caracterização do caule e da folha no ancestral das Lychnophorinae

As reconstruções dos estados ancestrais dos caracteres sugerem que o caule do ancestral comum mais recente (ACMR) das Lychnophorinae era do tipo 2, ou seja, os caracteres que definem os grupos de espécies caulirosuladas não estavam presentes no ACMR. O caule do ACMR hipoteticamente apresentava entrenós mais longos (ausência de entrenós reduzidos), cobertura representada por tricomas, os quais eram inconspícuos, com numerosos traços foliares nas porções terminais e sem feixes vasculares salientes na superfície, sem esclereídes nas porções terminais, sem esclereídes de dimensões diferentes entre os tecidos, sem endoderme secretora e sem epiderme remanescente sobre ramos lenhosos.

A folha do ACMR possivelmente era plana, com margem foliar igualmente plana, com arranjo simples de feixes vasculares na nervura central, sem criptas, sem células epidérmicas altas ou volumosas, sem cutícula espessa na face adaxial, com epiderme unisseriada, com estômatos e tricomas glandulares apenas na face abaxial, com indumento inconspícuo, com mesofilo bifacial delgado, sem hipoderme ou parênquima incolor na região mediana do mesofilo, sem numerosos feixes vasculares e extensões de bainhas dos feixes e com parênquima clorofiliano ao longo de todo o mesofilo.

A caracterização hipotética do caule e da folha do ACMR das Lychnophorinae sugere que esse táxon vivia num ambiente méxico, pois não são observadas quaisquer características xéricas, mais comuns nas linhagens mais “derivadas” de Lychnophorinae. A ocupação dos *campos rupestres* e cerrados do Domínio Cerrado provavelmente teria sido secundária, influenciada por fatores ecofisiológicos desses ambientes. De acordo com Coile e Jones (1981), as prováveis adaptações aos ambientes sazonalmente secos e com ocorrência periódica de fogo, têm tido um papel importante na diversificação das espécies de Lychnophorinae.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, foram observadas possíveis sinapomorfias para as folhas de Lychnophorinae, quatro para o gênero *Minasia*, duas para o gênero *Paralychnophora*, uma para o clado formado pelas linhagens *Chronopappus bifrons*, *Proteopsis* e *Heterocoma* e uma para o clado que abrange as linhagens Aliança *Prestelia*, *Anteremanthus*, *Chronopappus*, *Proteopsis*, *Heterocoma*, *Paralychnophora*, *Minasia*, ‘Bahian *Lychnophora*’,

Piptolepis, *Lychnophora* s. str. e *Eremanthus* s. str. Além disso, a ocorrência de determinados caracteres caulinares e foliares delimitando as principais linhagens de Lychnophorinae, sugerem que os mesmos possuem grande valor informativo para a taxonomia da subtribo. Foram observados 24 caracteres com estados altamente restritos a certos grupos, destes, seis são caulinares e 18 são foliares. Os demais caracteres também podem ser considerados informativos, especialmente se empregados em conjunto. Os resultados indicam que a evolução da diversidade morfológica e anatômica em Lychnophorinae parece ter sido direcionada por pressões adaptativas derivadas de fatores ecofisiológicos dos ambientes restritos em que habitam a maioria das espécies, principalmente as linhagens mais “derivadas”. Algumas características parecem ter influenciado fundamentalmente no sucesso das espécies de Lychnophorinae sobre o Domínio Cerrado: no caule, a sobreposição de folhas, a presença de indumento, de cloroplastos na epiderme e de esclereídes; na folha, o espessamento da cutícula, a presença de hipoderme e de tecidos potencialmente armazenadores de água e esclereídes. Além disso, os dados observados neste estudo sugerem que o hábito caulirosula possa ser uma convergência evolutiva, posterior à determinação de outras características adaptativas, como a cobertura dos caules por folhas sobrepostas e marcescentes. Levando em consideração tais resultados, se entende que investigações que combinam dados morfoanatômicos e filogenéticos, além de auxiliarem no entendimento da evolução dos grupos como um todo, também podem ser muito úteis para a compreensão dos padrões evolutivos de determinadas características que influenciaram a conquista de ambientes e nichos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcorn SM, Ark PA. 1953. Softening paraffin-embedded plant tissues. *Stain Technology* **28**: 55-56.

Baruch Z. 1979. Elevation Differentiation in *Espeletia Schultzii* (Compositae), A Giant Rosette Plant of the Venezuelan Paramos. *Ecology* **60**: 85-98.

Baruch Z, Smith AP. 1979. Morphological and physiological correlates of niche breadth in two species of *Espeletia* (Compositae) in the Venezuelan Andes. *Oecologia* **38**: 71-82.

Bosabalidis A, Kofidis G. 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* **163**: 375-379.

Coile, N. C., Jones, Jr. S. B. 1981. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus Endemic to the Brazilian Planalto. *Brittonia* **33**: 528-542.

Cuatrecasas J. 1933. Plantae colombianae novae. *Trabajos del Museo de Ciencias Naturales - Serie Botanica* **33**: 1-158.

Cuatrecasas J. 2013. *A Systematic Study of the Subtribe Espeletiinae (Heliantheae, Asteraceae)*. New York, New York Botanical Garden Press.

Dantas VL, Batalha MA. 2011. Vegetation structure: fine scale relationships with soil in a cerrado site. *Flora* **206**: 341-346.

Echternacht L, Trovó M, Oliveira CT, Pirani JR. 2011. Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. *Flora* **206**: 782-791.

Funk VA, Susanna A, Stuessy TF, Robinson H. 2009. Classification of Compositae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 171-189.

Gardoni LCP, Isaias RMS, Vale FHA. 2007. Morfologia e anatomia foliar de três morfotipos de *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae) na Serra do Cipó, MG. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 487-500.

Giulietti AM, Pirani JR, Harley RM. 1997. Espinhaço range region. In: Davis SD, Heywood VH, Herrera-MacBride O, Villa-Lobos J, Hamilton AC, eds. *Centres of Plant Diversity: a guide and strategy for their conservation. Vol. 3: The Americas*. Cambridge, WWF-IUCN, 397-404.

Givnish TJ, McDiarmid RW, Buck WR. 1986. Fire adaptation in *Neblinaria celiae* (Theaceae), a high-elevation rosette shrub endemic to a wet equatorial tepui. *Oecologia* **70**: 481-485.

Goodland R, Ferri MG. 1979. *Ecologia do Cerrado*. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo.

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

Hughes J, McCully ME. 1975. The use of an optical brightener in the study of plant structure. *Stain Technology*. **50**: 319-329.

Jensen, W. A. 1962. *Botanical histochemistry: principle and practice*. San Francisco, W. H. Freeman.

Karabourniotis G. 1998. Light-guiding function of foliar sclereids in the evergreen sclerophyll *Phillyrea latifolia*: a quantitative approach. *Journal of Experimental Botany* **49**: 739-746.

Karnovsky MJ. 1965. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of cell Biology* **27**: 137a-138a.

Keeley SC, Forsman ZH, Chan R. 2007. A phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: support from separate and combined congruent datasets (*trnL-F*, *ndhF*, ITS). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 89–103.

Keeley SC, Robinson H. 2009. Vernonieae. In: Funk VA, Susanna A, Stuessy TF e Bayer RJ, eds. *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*. Michigan, Sheridan Books, 439–469.

Loeuille, 2011. Towards a phylogenetic classification of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae). Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Luque R, Menezes NL, Semir J. 1999. Estructura primaria del tallo de *Lychnophora* Mart.(Vernonieae: Asteraceae). *Plantula* **2**(3): 141-152

Luque R, Menezes NL. 2003. Anatomia foliar de *Lychnophora* Mart.(Vernonieae: Asteraceae). *Plantula* **3**: 117-128

Lusa MG, Appezzato-da-Glória B, Loeuille B, Bartoli G, Ciccarelli D. 2014. Functional groups in Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on morphological and anatomical traits. *Australian Journal of Botany* **62**: 150-163.

Maddison W, Maddison D. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. <http://mesquiteproject.org>.

Mello-Silva R. 1990. Morphological and anatomical differentiation of *Vellozia hirsuta* populations (Velloziaceae). *Plant Systematics and Evolution* **173**: 197-208.

Melo-de-Pinna GFA. 2004. Anatomia foliar de *Richterago* Kuntze (Mutisieae, Asteraceae). *Acta botanica brasílica* **18**: 591-600.

Nakajima JN, Teles AM, Ritter M, Mondin CA, Dematteis M, Heiden G, Borges XB, Rivera VL, Bringer Jr JBA, Saavedra M, de Cássia Araújo Pereira R, Sales-de-Melo MRC. 2009. Asteraceae. In: Giuliatti AM, ed. *Plantas raras do Brasil: Conservação Internacional*. Belo Horizonte. Universidade Estadual de Feira de Santana, 76-89.

Nakajima JN, Dematteis M, Loeuille B, et al. 2013. Asteraceae. In: Martinelli G, Moraes MA, eds. *Livro vermelho da flora do Brasil*. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 203-286.

Nogueira A, El Ottra JHL, Guimarães E., Machado SR, Lohmann LG. 2013. Trichome structure and evolution in Neotropical lianas. *Annals of Botany* **112**: 1331-1350.

Pace MR, Lohmann LG, Angyalossy V. 2011. Evolution of disparity between the regular and variant phloem in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* **98**: 602–618.

Pace MR, Angyalossy V. 2013. Wood Anatomy and Evolution: A Case Study in the Bignoniaceae. *International Journal of Plant Sciences* **174**: 1014-1048.

Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**: 15-23.

Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany* **80**: 223-230.

Sajo MG, Wanderley MGL, Carvalho LM. 1995. Caracterização anatômica foliar para 14 espécies de *Xyris* L. (Xyridaceae) da Serra do Cipó, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **9**: 101-114.

Sakai WS. 1973. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology* **48**: 247-249.

Scatena V, Giulietti A, Borba E, van den Berg C. 2005. Anatomy of Brazilian Eriocaulaceae: correlation with taxonomy and habitat using multivariate analyses. *Plant Systematics and Evolution* **253**: 1-22.

Simon MF, Grether R, Queiroz LP, Skema C, Pennington RT, Hughes CE. 2009. Recent assembly of the cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of science* **106**: 20.359-20.364.

Skelton RP, Midgley JJ, Nyaga JM, Johnson SD, Cramer MD. 2012. Is leaf pubescence of Cape Proteaceae a xeromorphic or radiation-protective trait? *Australian Journal of Botany* **60**: 104-113.

Smith A, Young T. 1987. Tropical alpine plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 137-158.

Turner, IM. 1994. Sclerophylly - primarily protective? *Functional Ecology* **8**: 669-675.

Werker, E. 2000. Trichome diversity and development: *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* **31**: 1-35.

APÊNDICES

Apêndice 1. Lista de espécies de Lychnophorinae com estudo anatômico completo das folhas e dos caules, da região apical às regiões lenhosas.

Espécies	Nós caulinares avaliados	Coordenadas geográficas	Identificação do material
<i>Anteremanthus hatschbachii</i> H. Rob.	1° - 20°	S16°35'37.6'' W42°54'07.7''	Loeuille <i>et al.</i> 533
<i>Blanchetia heterotricha</i> DC.	1° - 15°	S12°54'11.1'' W39°12'06.6''	Loeuille <i>et al.</i> 680
<i>Chronopappus bifrons</i> (DC. ex Pers.) DC.	1° - 10°	S18°23'49.9'' W43°21'21.0''	Lusa <i>et al.</i> 63
<i>Eremanthus polycephalus</i> (DC.) MacLeish	1° - 30°	S18°11'52.0'' W43°37'33.0''	Loeuille <i>et al.</i> 531
<i>Heterocoma gracilis</i> Loeuille, J. N. Nakaj. & Semir.	1° - 15°	S18°07'42.1'' W43°22'40.5''	Lusa <i>et al.</i> 61
<i>Lychnophora tomentosa</i> (Mart. ex DC.) Sch. Bip.	1° - 10°	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	Loeuille <i>et al.</i> 528
<i>Lychnophora diamantinana</i> Coile & S.B. Jones	1° - 50°	S18°11'52.5'' W43°37'33.1''	Loeuille <i>et al.</i> 530
<i>Lychnophora triflora</i> (Mattf.) H. Rob.	1° - 50°	S13°31'33.4'' W41°57'55.5''	Loeuille <i>et al.</i> 673
<i>Minasia scapigera</i> H. Rob.	*	S18°12'52.9'' W43°35'44.1''	Loeuille <i>et al.</i> 529
<i>Paralychnophora bicolor</i> (DC.) MacLeish	1° - 20°	S13°31'33.7'' W41°57'56.7''	Loeuille <i>et al.</i> 672
<i>Piptolepis monticola</i> Loeuille	1° - 30°	S18°23'53.8'' W43°19'33.0''	Lusa <i>et al.</i> 62
<i>Prestelia eriopus</i> Sch. Bip.	*	S19°17'28.1'' W43°36'01.5''	Loeuille <i>et al.</i> 524
<i>Proteopsis argentea</i> Mart. & Zucc. ex Sch. Bip.	*	S19°06' W43°40'	Loeuille <i>et al.</i> 21

* Espécies com hábito caulirosula. Todos os nós foram analisados.

Apêndice 2. Lista das espécies de Lychnophorinae herborizadas utilizadas neste estudo

Espécies	Identificação do material
<i>Piptocarpha oblonga</i> (outgroup)	W. Hoehne 3207
<i>Pithecoseris pacourinoides</i> (outgroup) (= <i>Chresta pacourinoides</i>)	Loeuille 350
<i>Eremanthus argenteus</i>	Loeuille 839
<i>Eremanthus capitatus</i>	Grillo 47
<i>Eremanthus crotonoides</i>	Loeuille 25
<i>Eremanthus erythropappus</i>	Loeuille 861
<i>Eremanthus glomerulatus</i>	Loeuille 831
<i>Eremanthus incanus</i>	Cordeiro CFCR 10058
<i>Eremanthus leucodendron</i>	Loeuille et al. 669
<i>Eremanthus mattogrossensis</i>	Loeuille 453
<i>Eremanthus pabstii</i>	Loeuille 833
<i>Gorceixia decurrens</i>	Loeuille 821
<i>Heterocoma albida</i>	Nakajima 3074, Loeuille 450
<i>Hololepis pedunculata</i>	Loeuille 259
<i>Lychnophora crispa</i>	Harley PCD 4427
<i>Lychnophora ericoides</i>	Pirani 1726
<i>Lychnophora gardneri</i>	Loeuille 102
<i>Lychnophora granmogolensis</i>	Loeuille et al. 665
<i>Lychnophora joliana</i> sp. ined.	Loeuille 112
<i>Lychnophora pinaster</i>	Mello Silva 1389
<i>Lychnophora regis</i>	Hind PCD 3537
<i>Lychnophora santosii</i>	Loeuille et al. 668
<i>Lychnophora sellowii</i>	Loeuille 79
<i>Lychnophora syncephala</i>	Souza 5553
<i>Lychnophoriopsis candelabrum</i>	Loeuille 435
<i>Lychnophoriopsis hatschbachii</i>	Semir CFCR 9552
<i>Minasia alpestris</i>	Menezes CFCR 103
<i>Minasia cabralensis</i>	Loeuille 433
<i>Minasia ramosa</i> sp. ined.	Mello Silva 3223
<i>Paralychnophora harleyi</i>	Conceição 34
<i>Paralychnophora patriciana</i>	Loeuille 329
<i>Paralychnophora reflexoauriculata</i>	Loeuille 396
<i>Piptolepis ericoides</i>	Mello Silva 1377

Apêndice 2. Lista das espécies de Lychnophorinae herborizadas utilizadas neste estudo

Espécies	Identificação do material
<i>Piptolepis riparia</i> sp. ined.	Loeuille 516
<i>Piptolepis schultzi</i>	Loeuille 20
<i>Proteopsis hermogenesii</i> sp. ined.	Mello Silva 3008
<i>Sipolisia lanuginosa</i>	Loeuille 635
<i>Xerxes ekmaniana</i> (= <i>Heterocoma ekmaniana</i>)	Loeuille 838

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

Na presente tese foram investigadas as características morfoanatômicas e fitoquímicas de caules aéreos e folhas de espécies de Lychnophorinae, com o principal objetivo de fornecer novas informações para a subtribo e através dessas, colaborar ao entendimento evolutivo da subtribo.

Tradicionalmente, os estudos quimiotaxonômicos e quimioevolutivos têm sido muito utilizados sobre as espécies de Lychnophorinae. No entanto, pouco se sabia sobre a localização dos metabólitos de interesse nos caules e folhas das espécies. Os estudos apresentados no Capítulo 1 indicaram os principais locais de síntese dos metabólitos secundários: tricomas glandulares, idioblastos epidérmicos e tecidos parenquimáticos das folhas e dos caules. Além disso, as análises fitoquímicas evidenciaram a presença de flavonoides, derivados do ácido *trans*-cinâmico, lactonas sesquiterpênicas e poliacetilenos. Os dados apresentados são especialmente interessantes, pois apontam possíveis sinapomorfias de caracteres químicos menos usuais, como os derivados do ácido *trans*-cinâmico e poliacetilenos, além de possíveis sinapomorfias de lactonas sesquiterpênicas e flavonoides.

A presença de fitomelanina em Asteraceae (localizada em cípselas) é uma característica que vêm sendo empregada amplamente nos estudos taxonômicos e evolutivos da família. No capítulo 2, relatou-se a presença de fitomelanina em caules aéreos e folhas de Lychnophorinae, trazendo importantes novidades para o conhecimento dessa substância em Asteraceae. Além da presença em Lychnophorinae, as reconstruções dos estados ancestrais

da ocorrência de fitomelanina na subtribo, indicaram que a mesma já ocorria no ancestral comum mais recente da subtribo e também em outra subtribo de Vernonieae (grupo externo). Essas informações indicam que há muito a ser investigado sobre essa ocorrência em órgãos vegetativos aéreos em Vernonieae e em Asteraceae como um todo e que, como nas cipselas, a fitomelanina nos órgãos vegetativos poderia contribuir amplamente no entendimento dessa tribo e dessa família tão complexas.

No capítulo 3, nós apresentamos outra característica singular, observada ao longo das investigações morfoanatômicas de Lychnophorinae: um modo não usual de retenção de água sobre ápices caulinares. Nesse estudo, nós demonstramos que a substância hialina observada nessas regiões apicais é resultado da degradação parietal de tricomas não glandulares, sendo constituída principalmente por carboidratos, e possivelmente apresenta a função de proteger os órgãos jovens da dessecação até o seu pleno desenvolvimento. Além disso, essa substância é complexa, pois também apresenta metabólitos sintetizados por tricomas glandulares, os quais estão localizados junto aos tricomas não glandulares. Esses metabólitos provavelmente são fitotóxicos (terpenoides, compostos fenólicos e proteínas) e poderiam estar relacionados à proteção dos ápices contra herbívoros e patógenos. Tal observação foi feita em uma espécie endêmica dos *campos rupestres* (*Lychnophora diamantinana*) e é provável que essa característica peculiar tenha surgido isoladamente, como uma adaptação às condições ambientais peculiares dessa região, pois esse fenômeno não foi observado em outras espécies.

Durante as investigações anatômicas de caules e folhas de Lychnophorinae, nós observamos características peculiares, frequentemente relatadas como xéricas, tais como: folhas sobrepostas, ocorrência de criptas, células epidérmicas altas ou volumosas e

hipoderme nas folhas, indumento conspícuo e esclereídes tanto em folhas, como em caules, entre outras características. Essa informação nos motivou a investigar se tais características poderiam ser consideradas possíveis adaptações aos ambientes de ocorrência das espécies de Lychnophorinae e se essas espécies mostravam algum padrão que as agrupava, baseado nessas características peculiares. Para isso, propomos uma colaboração com a pesquisadora Dra. Daniela Ciccarelli, a qual investiga os papéis ecológicos de certos grupos funcionais no ambiente. Através dessa parceria (onde realizei meu estágio de pesquisa no exterior), realizamos análises multivariadas (PCoA) e identificamos quatro grupos funcionais entre as Lychnophorinae: I, espécies adaptadas a ambientes mais úmidos (linhagem mais “basal” de Lychnophorinae); II, espécies com características intermediárias, relacionadas a ambientes frequentemente sujeitos a neblina; III, espécies bem adaptadas aos *campos rupestres*; e IV, espécies que apresentam as características morfológicas e anatômicas mais especializadas aos *campos rupestres* (representado exclusivamente pelas espécies com hábito caulirosula). Os resultados indicaram que as espécies agrupadas, ocupavam os mesmos nichos, os quais refletiam condições específicas nos diferentes ambientes.

Finalmente, após a conclusão das análises anatômicas nas espécies escolhidas para esse estudo, nós pudemos observar dois padrões caulinares ocorrendo nos caules das Lychnophorinae, estritamente relacionados com os hábitos: um observado nas espécies caulirosuladas e outro, ocorrendo em todos os demais hábitos. Contudo para as folhas, eram visualizadas muitas características, que em geral, não mostravam relações entre os representantes das linhagens principais de Lychnophorinae. Portanto, nós decidimos aumentar a nossa amostragem, adicionando espécies filogeneticamente próximas daquelas

previamente analisadas, bem como algumas linhagens não amostradas. Após a análise do novo material, as características morfoanatômicas de Lychnophorinae foram mapeadas na filogenia do grupo (Loeuille, 2011) e geraram importantes informações, como a identificação de oito possíveis sinapomorfias e de 24 características diagnósticas para as linhagens da subtribo.

Levando-se em consideração os estudos previamente realizados para identificação dos grupos funcionais de Lychnophorinae e as tendências observadas nos estudos evolutivos da subtribo nós acreditamos que certas características influenciaram no sucesso que as espécies de Lychnophorinae tiveram sobre o Domínio Cerrado, especialmente sobre os *campos rupestres*. Essas características são: no caule, a sobreposição de folhas, a presença de indumento, de cloroplastos na epiderme e de esclereídes; na folha, o espessamento da cutícula, a presença de hipoderme e de tecidos potencialmente armazenadores de água e esclereídes. A ocorrência do hábito caulirosula indica provável convergência adaptativa. Além disso, as informações geradas nesse estudo sugerem que a evolução da diversidade morfológica e anatômica em Lychnophorinae pode ter sido direcionada por pressões adaptativas, derivadas de fatores ecofisiológicos dos ambientes restritos em que habitam a maioria das espécies.

