

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Rafaela Jorge Trad

“Estudos taxonômicos e biosistemáticos no complexo

*Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Calophyllaceae)”

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Rafaela Jorge Trad  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do  
Título de Mestre em Biologia  
Vegetal

*Maria do Carmo Estanislau do Amaral*

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T674e Trad, Rafaela Jorge, 1987-  
Estudos taxonômicos e biosistemáticos no complexo  
*Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Calophyllaceae) /  
Rafaela Jorge Trad. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Maria do Carmo Estanislau do Amaral.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cerrados. 2. Hibridação vegetal. 3. Genética  
de populações. 4. Anatomia vegetal. 5. Complexo de  
espécies. I. Amaral, Maria do Carmo Estanislau do,  
1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Taxonomic and biosystematics studies in the complex *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Calophyllaceae)

**Palavras-chave em**

**Inglês:** Cerrado

Plant hybridization

Population genetics

Plant anatomy

Plants species complex

**Área de concentração:** Biologia Vegetal

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal

**Banca examinadora:**

Maria do Carmo Estanislau do Amaral [Orientador]

Maria Imaculada Zucchi

Juliana Lischka Sampaio Mayer

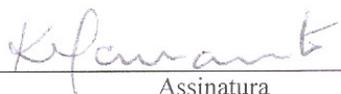
**Data da defesa:** 27-01-2012

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Vegetal

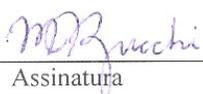
Campinas, 27 de janeiro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra . Kikyo Yamamoto

  
Assinatura

Dra. Maria Imaculada Zucchi

  
Assinatura

Dra. Juliana Lischka Sampaio Mayer

  
Assinatura

Prof. Dr. João Semir

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Fábio Pinheiro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

# Índice

<b>RESUMO/ABSTRACT</b> .....	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> – <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. e o cerrado .....	1
<b>CAPÍTULO 1</b> – Questões taxonômicas envolvendo o complexo <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. (Calophyllaceae).....	15
<b>CAPÍTULO 2</b> – Estrutura foliar de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. subsp. <i>coriacea</i> e <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. subsp. <i>tomentosa</i> (Cambess.) Saddi e <i>Kielmeyera grandiflora</i> (Wawra) Saddi .....	68
<b>CAPÍTULO 3</b> – Diversidade e estrutura genética em populações de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. (Calophyllaceae).....	91
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	133
<b>ANEXOS</b> .....	137

## Índice de Figuras

### INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Esquema das fisionomias do cerrado retirado de Furley (1999) .....	6
Figura 2: Mapa apresentado em Furley (1999) com a distribuição das fisionomias vegetais do Brasil .....	8

### CAPÍTULO 1

Figura 1: Imagens ilustrando alguns dos locais de coleta de indivíduos/populações .....	35
Figura 2: Flores de <i>K. coriacea</i> : masculina e hermafrodita .....	39
Figura 3: Esquema foliar representando a venação foliar típica de <i>K. grandiflora</i> .....	41
Figura 4: Imagem ilustrando o padrão foliar de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> .....	43
Figura 5: Padrão de nervuras de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> .....	45
Figura 6: Material exemplificando um caso de identificação incorreta .....	47
Figura 7: Fotografia do tipo de <i>K. coriacea</i> .....	50
Figura 8: Indivíduo de <i>K. grandiflora</i> coletado em Sorocaba (SP).....	51
Figura 9: Registros de ocorrência simpátrica de diferentes espécies/subespécies de <i>Kielmeyera</i> . A. <i>K. grandiflora</i> e <i>K. rubriflora</i> . B e C. <i>K. grandiflora</i> e <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> . D. <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> e <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> .....	52
Figura 10: Indivíduo de <i>K. coriacea</i> com folhas afetadas por herbivoria .....	54
Figura 11: Indivíduo de <i>K. grandiflora</i> com folhas não glaucas .....	55
Figura 12: Indivíduos de <i>K. coriacea</i> de tamanho reduzido. A: Indivíduo adulto mostrando as folhas reduzidas. B: Indivíduo de porte menor, com frutos pequenos .....	56
Figura 13: Possível representante de <i>K. tomentosa</i> descrita por Cambessèdes. A: Visão geral do espécime. B: Detalhe das folhas e flores .....	56

### CAPÍTULO 2

Figura 1: Esquema as regiões utilizadas nas análises anatômicas.....	73
Figura 2: Secções transversais de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> . A e D. Região mediana. B, C e E. Região marginal .....	79
Figura 3: Comparação entre secções transversais de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> (A, C, E e G) e <i>K. grandiflora</i> (B, D, F e H). A, B, G e H. Região mediana. C, D, E e F. Região marginal.....	80
Figura 4: Secções paradérmicas de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> (D e E) e de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> (A, B, C e F).....	81

Figura 5: Secções fotografadas sob luz polarizada pertencentes a <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> (A, B e E) e a <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> (C, D e F) .....	82
Figura 6: A e B – Detalhes de feixes vasculares secundários em secção transversal (A – <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> . B – <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> ) e C: <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> - Drusas .....	83

### CAPÍTULO 3

Figura 1: Indivíduo com a placa de metal utilizada na marcação das populações.....	103
Figura 2: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Structure para k=2 .....	107
Figura 3: Agrupamento pelo método do UPGMA colorido conforme a categoria taxonômica .....	110
Figura 4: Agrupamento pelo método do UPGMA colorido conforme a localidade geográfica .....	111
Figura 5: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids para <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> .....	117
Figura 6: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids para <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i> .....	119
Figura 7: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids para <i>K. grandiflora</i> .....	121

## Índice de Tabelas

### CAPÍTULO 1

Tabela 1: Locais de coletas das populações e respectiva identificação.....	34
Tabela 2: Coleções de herbários analisadas e fotografadas.....	37

### CAPÍTULO 2

Tabela 1: Identificação, origem dos indivíduos utilizados no trabalho, comprimento foliar e região isolada para realização dos estudos anatômicos organizados por população.....	72
--	----

### CAPÍTULO 3

Tabela 1: Marcadores utilizados e suas características .....	101
Tabela 2: Valores do índice de diversidade de Shannon por população .....	112
Tabela 3: Diversidade considerando as 27 populações como subpopulações de uma .....	114
Tabela 4: Diversidade considerando as 27 populações conforme localidade geográfica.....	114
Tabela 5: Diversidade considerando as 27 populações divididas por espécie e subespécies .....	114
Tabela 6: Legenda das populações utilizadas no Newhybrids .....	122

## Índice de Anexos

Anexo 1 – Descrições originais e respectivas ilustrações .....	138
Figura 1: Ilustração de <i>K. coriacea</i> Mart. & Zucc.....	140
Figura 2: Ilustração de <i>K. tomentosa</i> (Cambess.).....	143
Figura 3: Ilustração de <i>K. oblonga</i> Pohl .....	146
Figura 4: Ilustração de <i>K. microphylla</i> Pohl.....	148
Figura 5: Ilustração de <i>K. coriacea</i> var. $\beta$ <i>grandiflora</i> .....	151
Anexo 2 – Protocolo utilizado para extração de DNA genômico em <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. e <i>K. grandiflora</i> (Wawra) Saddi .....	154
Anexo 3 – A. Gel de Quantificação de DNA (agarose 1%). B. Gel de PCR (agarose 3%) .....	156
Anexo 4 – Gel de poliacrilamida 6% do <i>primer 7</i> .....	157

# Agradecimentos

De todo o mestrado esse foi o texto mais difícil de escrever, porque para ele não existe uma base, nem um artigo de referência ou apoio. Antes de começar os agradecimentos propriamente ditos gostaria de deixar registrado aqui o quanto gostei de trabalhar com *Kielmeyera coriacea*; essa espécie me conquistou e me marcou de maneira quase inexplicável e para quem não teve a oportunidade de ver uma árvore dessas, já conto que são lindas, cheirosas e únicas.

Gostaria de agradecer a CAPES e ao CNPq pelo auxílio e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal/IB – Unicamp por todo o suporte para que pudesse realizar o trabalho.

A minha orientadora, Dra. Maria do Carmo, muito obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos. Ao Dr. Volker Bittrich pelos artigos, correções e ensinamentos.

Aos meus pais o maior obrigada que eu puder dizer, por terem sido pais, motoristas, auxiliares de campo, pelas noites viradas planilhando dados e até por terem sido um pouquinho pesquisadores comigo nesses dois anos.

A minha irmã pela paciência nos dias que eu queria explodir o mundo e pela ajuda com as planilhas gigantes de 0 e 1.

Ao Danilo, meu anjo da guarda e grande amigo, por tudo que me ensinou, pelas manhãs, tardes e noites dividindo bancada, por nunca ter deixado de atender o telefone de noite quando eu ligava desesperada e com medo de ter feito besteira e por esse tempo todo ter sido o “pai” da Kielmeyeras mesmo com um oceano de distância.

Agradeço aos amigos por terem garantido minha sanidade mental e por estarem do meu lado desde o começo. Peço desculpas por não poder escrever uma linha para cada um, adoraria, mas seria uma nova dissertação.

A Lari (pelas risadas nos treinos de vôlei), a Tamie (por todos os momentos divertidos) e a Bia (por ser mais que uma amiga de trabalho), três amigas indescritíveis que estiveram presentes em todos os momentos divertidos, mas também compartilharam e viveram muitas das angústias comigo.

A alguns seres que surgiram em 2009 e mudaram muita coisa: ao Nada Mal pelas noites que me fez companhia no laboratório, mesmo estando em São Paulo, pelas risadas e conversar sérias e pela amizade; ao Kauê por sempre me lembrar das “gramas” do

cerrado e ter se tornado quase um irmão; a Robertinha e ao Fefê por terem me dado uma “segunda família”; ao Peixe por seu jeito único e ter se mostrado um amigo mais que especial; ao Pai Chico não tenho palavras (você sabe); ao professor (Flatú!) por ter tornado minha vida mais feliz; a Jaspion e a Picles por terem vivido muito disso junto comigo; a Fer por adorar tabelas e ser a minha amiga de “parto”.

Júlia, Márcia, Passa, Xirra, Jaú, Batman, Bel, Stefanie, Dirve-in, Porpeta, Tio Chico, Jólia, Alê, Potão, Alonso, Meleca e Guima obrigada por estarem perto, mesmo longe.

Ao Marcelinho e ao Rubens pela ajuda e companhia no primeiro campo do mestrado, quando eu mal sabia identificar uma *Kielmeyera coriacea*. Ao Gu e a Deise pelo campo maluco em Diamantina, pela amizade e por toda a ajuda desde sempre.

Aos amigos do muay thai, em especial às meninas pelas conversas pulando corda que me faziam esquecer quando perdia um dia de experimentos. A Cacá, Renatinha, Gu, Dani, Mi e Tefa pelos sucos, receitas trocadas e treinos divertidos. Aos meninos, pela amizade e por sempre terem demonstrado interesse no meu trabalho, mesmo achando que eu planto feijãozinho.

Ao pessoal dos laboratórios que passei:

- taxonomia – aos que nunca deixaram de ser amigos mesmo quando eu sumia por meses; obrigada pelas dúvidas tiradas, pelos sucos no meio da tarde, pelas discussões de taxonomia e por tudo que aprendi com vocês;
- CBMEG – aos que me ajudaram a ser babá de computador, me ensinaram muita coisa de um universo que era distante demais para mim até 2009 e fizeram com que eu me sentisse “em casa” para trabalhar;
- anatomia – às meninas pela ajuda com técnicas e conversas divertidas durante o trabalho.

Aos técnicos Pathy (pelos infinitos géis preparados e pelas risadas lavando cubas), João Carlos e Tião (por terem se mostrado dispostos a ajudar sempre que precisei e pelos ensinamentos), Juverlande e Carlão. A Dona Luzia pela companhia no laboratório quando ainda não tinha nem amanhecido.

A Dra. Kikyo Yamamoto pelos ensinamentos, oportunidades e amizade.

Ao Prof. Jorge Tamashiro pelas tardes olhando material comigo, por ter me ajudado demais com os textos em latim, pelos questionamentos e correções e por compartilhar a paixão por doces e incentivar minhas experiências culinárias.

A Dra. Maria Zucchi pelas valiosas explicações e discussões, pela ajuda no trabalho com uma matriz grande de dados e pelas sugestões na pré-banca.

A Dra. Aluana Abreu por não ter desistido das análises mesmo quando os programas apresentaram vários problemas novos, por tudo que aprendi e pela paciência com os numerosos e-mails.

A Dra. Juliana Mayer pelas conversas esclarecedoras no laboratório e pelas sugestões que enriqueceram muito o trabalho.

A Lea que sempre dava um jeitinho de me ajudar.

A Cris, eterna companheira de “night lab” e problemas com DNAs.

A Dra. Anete P. Souza pelo suporte, discussões e sugestões a respeito do trabalho.

As Dras. Marília Castro e Sandra Carmello-Guerreiro por toda a ajuda com a parte de anatomia.

Ao Dr. João Semir por todas as dúvidas tiradas e aulas de taxonomia no laboratório.

A Dra. Eliana Martins por toda a ajuda durante o mestrado.

Às amigas do time de handebol (Dani, Carla, Duda, Cris, Amanda, Re, Lari...) pelos campeonatos e treinos pesados, por todos os momentos de diversão, apoio e compreensão.

Ao Vinícius, a Juliana e a todo o pessoal de Barreiras que me ajudou num campo, sem nem saber quem eu era.

A Nazareth por toda a ajuda durante o campo no Mato Grosso.

Aos meus tios, tias e primos que estiveram do meu lado e me receberam em casa, mesmo chegando de madrugada e suja de um campo.

Aos curdores dos herbários que visitei, por sempre terem me recebido muito bem e pelos empréstimos de material de grande valor que foram de grande valor.

Ao curador do Herbário UEC, Dr. Washington Marcondes, a Lívia e a Zaira.

**RESUMO**

**ABSTRACT**

## RESUMO

O cerrado, uma formação vegetal típica do Brasil central, é um dos biomas com maior biodiversidade de espécies, sendo classificado como um “hotspot”. Atualmente, a ação antropogênica no cerrado tem causado muito desmatamento, ameaçando a existência de muitas espécies. *Kielmeyera* Mart. & Zucc. (Clusiaceae s.l./Calophyllaceae) é um gênero com aproximadamente 50 espécies, das quais várias ocorrem no cerrado. Morfologicamente o gênero é caracterizado por apresentar flores vistosas com corola contorta e numerosos estames, ovário trilobular e cápsulas lenhosas com numerosas sementes aladas. Um dos elementos mais conspícuos do cerrado é *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc., uma espécie altamente variável morfologicamente. A espécie apresenta a maior amplitude ecológica para o gênero e sua distribuição geográfica coincide, em maior parte, com a distribuição do cerrado. *K. coriacea* é facilmente reconhecida por apresentar súber espesso, folhas verdes caducas e aglomeradas nos ápices dos ramos, padrão de venação característico e flores alvas e odoríferas. Na última revisão realizada para o gênero *Kielmeyera* (Saddi 1982), a circunscrição de *K. coriacea* foi alterada, mas permaneceu problemática. Visando organizar a variação, o autor propõe o reconhecimento de duas subespécies e sete variedades, formando o que é conhecido atualmente como “complexo *K. coriacea*”. Faz parte desse complexo também a espécie *K. grandiflora* (Wawra) Saddi, considerada antes uma variedade de *K. coriacea*. Para estudar o complexo o presente trabalho utilizou abordagens taxonômicas convencionais, a anatômica e a genética. Foram realizadas observações de material de herbário e cortes das regiões marginais e medianas de folhas adultas de cinco populações, sendo: duas de *K. coriacea* subsp. *coriacea*, duas de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e uma de *K. grandiflora*, constituídas por dois indivíduos cada população. Para estudos de genética populacional foram utilizados 12 pares de *primers* previamente desenvolvidos a partir de uma biblioteca enriquecida de microssatélites. Os marcadores foram amplificados em 27 populações com 20-30 indivíduos cada. A anatomia estrutural apresentou dois padrões claramente distintos e a genética populacional indicou grande semelhança entre os táxons pertencentes ao complexo. Os resultados não corroboram a proposta de Saddi para taxonomia da espécie.

## ABSTRACT

The Cerrado, a savanna-like vegetation typical of Central-Brazil, is one of the most species rich biomes of the world. It was classified as a "Biodiversity Hotspot". It is suffering strong anthropogenic pressures of different sources, and quite a number of species is seriously threatened. *Kielmeyera* Mart. & Zucc. (Clusiaceae s.l./ Calophyllaceae) is a genus of nearly 50 spp., several of which occur in the cerrado. Morphologically, the genus is characterized by large flowers with a contorted corolla and numerous stamens, a 3-locular ovary, and septicial woody capsules with numerous winged seeds. One of the most common elements of the cerrado is *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc., a morphologically highly variable species. It shows the widest ecological amplitude within the genus and its geographical distribution largely coincides with the cerrado biome. This species can be easily recognized by the thick corky bark, green coriaceous caducous leaves crown-like condensed at the end the branches, a characteristic venation and odoriferous, white flowers. In the last revision of the genus *Kielmeyera* (Nagib Saddi, 1982), the circumscription of *K. coriacea* remained problematic. To cope with a high variability, Saddi proposed two subspecies and seven varieties. The species is taxonomically so problematic that it is usually referred to as the "*K. coriacea* complex", to which also belongs *K. grandiflora* (Wawra) Saddi, formerly included as a variety in *K. coriacea*. To help with the taxonomic study of this complex, the study was done with taxonomy work, population genetics and structural anatomy of the leaves. For anatomy, two populations from each subspecies of *K. coriacea* and one population of *K. grandiflora*, consisting of 2 plants, were sampled. For genetics studies twelve primers pairs were selected between the ones previously developed from an enriched library of *K. coriacea*. Two patterns were found according to the structural anatomy and taxonomy observations suggest that there are two or more species in the complex. According to genetics, the banding pattern varies from one to eight bands per individual. *K. grandiflora* showed a similar banding pattern. For our study we treated each subspecies of *K. coriacea* as one group and *Kielmeyera grandiflora* as a third. We sampled at least 5 populations for each group and 20-30 plants to represent each population. The results show how genetically similar individuals of *K. coriacea* are. They do not corroborate most of Saddi's ideas for a subdivision of the *K. coriacea* complex, but suggest that *K. grandiflora* and *K. coriacea* are distinct species (as proposed by Saddi) and that possibly the two subspecies of *K. coriacea* actually represent two distinct species.

# **INTRODUÇÃO GERAL**

***Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e o cerrado**

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Apresentação do “complexo *K. coriacea*”

O gênero *Kielmeyera* Mart. & Zucc. pertence à família Calophyllaceae e compreende cerca de 47 espécies distribuídas principalmente no Brasil, em regiões de baixa altitude (Saddi 1982, Stevens 2001 em diante).

A revisão mais recente do gênero foi realizada por Saddi (1982), baseada principalmente em caracteres morfológicos. Entre as propostas apresentadas no trabalho está a série *Coriaceae*, distinta das demais pelas folhas coriáceas com a base da nervura central expandida, pelo hábito arbóreo/arbustivo, caule fortemente suberoso e xilopódio ausente. Apenas duas espécies foram incluídas nesta série: *K. coriacea* (com numerosas sinonimizações) e *K. grandiflora* (novo status para *K. coriacea* var.  $\beta$  *grandiflora* Wawra). Ao elevar a variedade  $\beta$  *grandiflora* de Wawra ao nível específico, Saddi (1982) menciona que *Kielmeyera grandiflora* seria distinta de *K. coriacea* pelo padrão de venação foliar.

A circunscrição da espécie *K. coriacea* segundo Saddi (1982) criou o que atualmente é conhecido como “complexo *K. coriacea* ” e gerou questionamentos com relação à inclusão de *K. tomentosa* Cambess. em *K. coriacea*, uma vez que esses táxons diferem em diversos caracteres descontínuos.

Dificultando a identificação de espécimes por taxonomistas, Saddi reconheceu sete variedades para a espécie *K. coriacea*, distribuídas em duas subespécies: *K. coriacea* subsp. *coriacea*, com quatro variedades, e *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (antiga *K. tomentosa*), com três variedades (ver capítulo de taxonomia para mais detalhes).

Na proposta do autor, as subespécies seriam distintas por um conjunto de caracteres morfológicos e distribuição geográfica desigual ou parcialmente sobreposta e as variedades seriam reconhecidas por diferenças morfológicas pequenas em caracteres muitas vezes contínuos, com as respectivas populações sendo muitas vezes simpátricas. Essas definições indicam a possibilidade de existência de numerosas zonas de hibridação entre as subespécies e variedades do complexo, o que dificultaria a identificação de indivíduos.

Além disso, as variedades atribuídas a cada uma das duas subespécies são reconhecidas frequentemente com base em caracteres quantitativos, possivelmente contínuos e de interpretação subjetiva e o autor relacionou um número muito restrito de

espécimes. Saddi (1986) admite, no entanto, que algumas de suas variedades poderiam vir a assumir o status de espécie por meio de estudos mais aprofundados.

Caddah (2009) e Bittrich (comunicação pessoal) relatam a existência de numerosas identificações incorretas das espécies pertencentes ao complexo (*K. coriacea* e *K. grandiflora*), algumas delas realizadas pelo próprio Saddi. Uma vez que *Kielmeyera coriacea* aparece em várias listas e estudos (Goodland 1971b, Silva *et al.* 1996) como um dos principais componentes do cerrado é de grande importância a realização de estudos no complexo. Tais estudos foram iniciados por Caddah (2009) e sugeriram a hibridação entre *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. grandiflora*. A subespécie *tomentosa*, porém, não foi incluída, sendo necessário um novo estudo para, em conjunto com os dados obtidos por Caddah (2009), permitir uma análise do complexo como um todo.

*K. coriacea* chega a ser citada até como a sexta espécie com mais indivíduos (cerrado de Brasília, Silva *et al.* 1996) e com ocorrência que atingiu até 79% das fisionomias de cerrado (Goodland & Ferri 1979, Ratter *et al.* 2003). O cerrado como um complexo gradiente vegetacional, que varia de uma quase-campina a uma quase-floresta de maneira gradual e contínua (Goodland & Ferri 1979), apresenta as espécies com grande diversidade morfológica.

## **2. Cerrado**

### **2.1. Histórico dos estudos do cerrado até a hipótese de escleromorfismo oligotrófico**

Atualmente existe uma quantidade considerável de estudos relacionados ao cerrado (Ratter *et al.* 1997, 2003, Felfili *et al.* 1993, Goodland & Ferri 1979, Durigan *et al.* 1987, 2003a, 2003b), porém esse bioma amplamente afetado pelas ações antrópicas (a taxa de desmatamento ao ano é estimada em 1,1% da área original por Machado *et al.* 2004, Pennington *et al.* 2005) ainda tem muito a ser conhecido a respeito de suas 10.000 espécies de plantas (Myers *et al.* 2000).

O cerrado inicialmente atraiu a atenção de conhecidos naturalistas, mas o primeiro estudo ecológico, até hoje reconhecido como uma valiosa análise do cerrado, foi o de J. E. B. Warming realizado em Lagoa Santa (MG) (1892, traduzido em 1908) (Goodland & Ferri 1979).

Durante o século XIX surgiu a questão sobre o motivo da ocorrência do cerrado, com vegetação xeromorfa, em tão ampla extensão se o clima não pode ser considerado árido, pois existe uma estação seca e outra úmida. Na década de 1940 alguns estudos (Rawitscher 1942, Ferri 1943, Rawitscher *et al.* 1943, Ferri 1944, Rawitscher & Rachid 1946, Rachid 1947 e Waibel 1948) levantaram dados que discordavam das hipóteses de que a vegetação do cerrado seria xerófita e de que a ocorrência deste bioma estar condicionada à limitação hídrica.

Em um estudo no cerrado de Emas, Ferri (1944) notou características morfológicas de plantas adaptadas a condições secas como árvores e arbustos com trocos e ramos tortuosos, cascas grossas, folhas coriáceas com superfícies brilhantes ou revestidas por tricomas (de diversos tipos e presentes em uma das ou nas duas faces) ou escamas. Quanto à anatomia, os estômatos apresentaram-se em cavidades e há tecidos de sustentação (esclerênquima) em grande quantidade, epiderme bisseriada, hipoderme e com frequência parênquima de reserva de água. (Ferri 1977)

Por outro lado, havia raros sinais de murchamento das plantas mesmo no auge da estação seca; muitas plantas floresciam e germinavam antes da estação chuvosa; nem toda a vegetação é decídua; a maioria das plantas lenhosas apresenta raízes muito profundas e transpira livremente; o solo é úmido o ano todo (com exceção dos dois metros mais superficiais); é comum a presença de xilopódios; numa mesma área climática a ocorrência de floresta e cerrado lado a lado estava relacionada à nutrição do solo, sendo os cerrados presentes nos solos mais pobres. Com esse conhecimento, passou-se a aceitar que a vegetação do cerrado não era xerófita e surgiu uma nova questão: por que as plantas lenhosas de cerrado apresentam tais características se não há restrição hídrica?

Na década de 1950, sabia-se que a vegetação não era xérica, que praticamente não havia muita falta de água, pelo menos para as plantas de maior porte, e que o cerrado geralmente se encontra em solos lixiviados e pobres em nutrientes e lixiviados. Para explicar a ocorrência do cerrado, Arens, Ferri e Coutinho (1958) propuseram a hipótese do “escleromorfismo oligotrófico”. Essa hipótese explica algumas das modificações morfoanatômicas: o tamanho reduzido de algumas árvores seria causado pela dificuldade de crescimento; a produção excessiva de carboidratos e lipídios permitiria a formação de cutículas espessas, cascas grossas, produção de cera, presença de hipoderme e esclerênquima em grande quantidade (nas folhas), tamanho reduzido das células e nervuras muito desenvolvidas.

Com novos estudos (Goodland 1971a, Jacomine 1969) a hipótese do escleromorfismo oligotrófico foi modificada, sendo incluído mais um fator que estaria envolvido como uma das causas da morfologia da vegetação de cerrado: a presença de grande quantidade de alumínio nos solos. Esse metal pode ser tóxico e é responsável pela acidificação quando hidrolisado, alterando a solubilidade – e assim a disponibilidade – de outros minerais.

## 2.2. Definição de cerrado

A delimitação do cerrado pode variar conforme o autor adotado e, inevitavelmente, confunde-se com o conceito de savana. Para demonstrar a dificuldade existente em abordar o tema, Walter (2006) menciona a existência de 48 expressões diferentes somente para tratar as divisões de vegetação do Brasil.

Em 1951, Kuhlmann indicou a discussão que começaria nas décadas seguintes “[Apesar do]...aspecto *sui generis*...não nos permite, de maneira alguma enquadrá-la num sistema rígido de classificação fitofisionômica”. Em seu trabalho o autor mencionou campo limpo, campo cerrado, cerrado típico e cerradão (Walter 2006).

Tanto cerrado quanto savana são palavras sem uma única definição correta. Cole (1960) comenta que entre os tipos de vegetação existentes, a savana é o de definição mais difícil, sendo a menos compreendida e cujas origem e distribuição são controversas. Goodland (1971b) menciona que o cerrado é um “grande mosaico de fisionomias” chamando a atenção para a dificuldade de um conceito que abranja toda essa variação de formas vegetacionais.

Trabalhos conhecidos como Rizzini (1970), Hueck (1972), Sarmiento (1983), Cole (1986), Felfili e Silva Junior (1993) e Ratter e colaboradores (1997), entre outros, consideram o cerrado subordinado ao conceito de savana, enquanto outros, como Eiten (1972, 1978), defendem o contrário. Segundo Dias e colaboradores (1996), Eiten (1972) afirma que o cerrado (*sensu lato*) é uma unidade ecológica típica da zona tropical, caracterizado por uma vegetação de fisionomia e flora próprias, classificado dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana.

Essa dificuldade de definição dos termos, associada a estudos (Sano *et al.* 2008, Pennington *et al.* 2005, Cole 1986) que indicam maior grau de diversidade nos cerrados e possíveis diferentes origens para essas vegetações “secas”, permite que se considere o cerrado como um bioma único, distinto das savanas, do pantanal e da caatinga.

Conforme Oliveira-Filho e colaboradores (1989), o cerrado como um todo (*sensu lato*) é uma vegetação parecida com a savana (“savanna-like”), que além de fisionomias semelhantes (cerrado *sensu stricto*), inclui matas de galeria e “grasslands”. Ele é definido através de florística e formas de crescimento (Walter 2006).

Abaixo se encontram as definições simplificadas do gradiente fisionômico do cerrado conforme Coutinho (1978) (Figura 1):

- campo limpo: formação composta somente por estrato graminoso;
- campo sujo: predomínio do estrato graminoso com arbustos dispersos;
- campo cerrado: estrato arbustivo-graminoso mais aberto e com poucas árvores;
- cerrado *sensu stricto*: vegetação com estrato arbustivo-graminoso fechado e árvores dispersas;
- cerradão: formação florestal densa com variação no grau em que o estrato arbóreo está fechado.

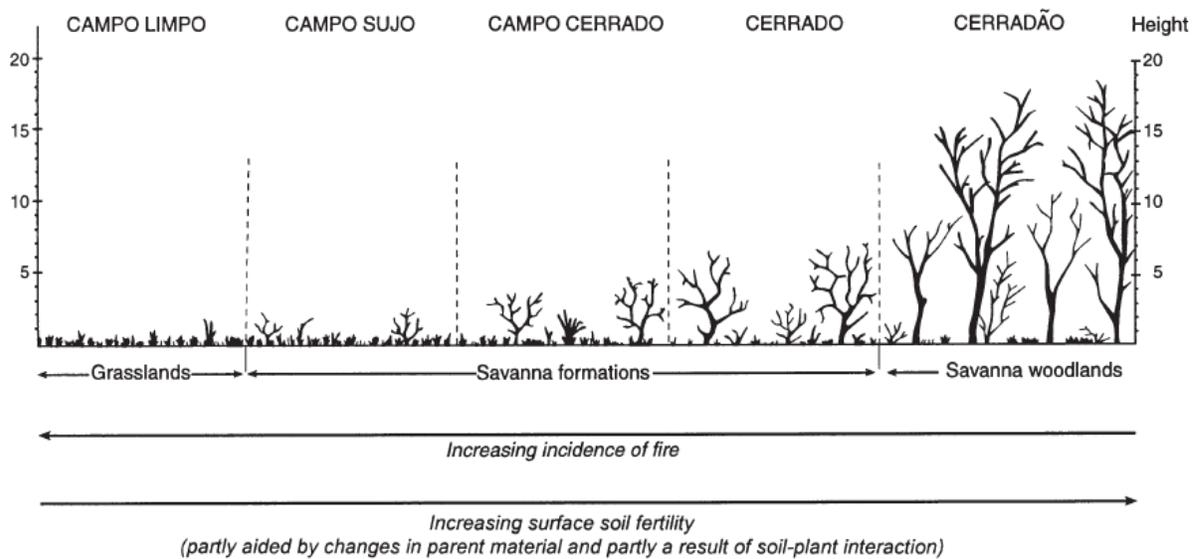


Figura 1: Esquema das fisionomias do cerrado retirado de Furley (1999).

Considerando toda essa variedade de delimitações do cerrado, cabe mencionar uma descrição de Martius (1840/1906, 1943), primeiro a tentar definir os biomas brasileiros, obtida em Walter (2006):

“Delicadeza, fina concepção e variedade bizarra, eis o caráter geral das formas vegetais domiciliadas nessa região. Em relação às formas das florestas, elas estão como uma variação dum músico para o seu tema...Assim parece que a Natureza aqui nos campos aprimorou a matéria vegetal que foi empregada, mais toscamente e em maior

quantidade, nas folhas sumarentas e nas mais vistosas flores das plantas silvestres, produzindo formas mais graciosas e nobres”. Mesmo antigo este trecho atenta para beleza e particularidades do cerrado.

### 2.3. Caracterização

O bioma cerrado é um dos principais centros de diversidade do mundo com cerca de 10.000 espécies de plantas, 161 mamíferos, 837 aves, 120 répteis e 150 anfíbios listados por Myers e colaboradores (2000). Ele é considerado um “hotspot” de biodiversidade de importante conservação (Myers *et al.* 2000) dado o elevado grau de endemismo registrado que chega a 44% para plantas no geral (Cardoso da Silva & Bates 2002) e 70% somente para o extrato herbáceo (Machado *et al.* 2004, Pennington *et al.* 2005). É possível encontrar ao menos uma de suas fisionomias na maior parte dos estados do Brasil (Goodland & Ferri 1979).

Sua área de distribuição original varia entre 1,5 e 2 milhões de quilômetros quadrados, o equivalente a cerca de 20% do território brasileiro (Oliveira-Filho *et al.* 1989, Furley 1999, Alho & Martins 1995). Uma estimativa de Alvim e Araújo (1952) indica que o cerrado ocupa na área “core” 1,5 mi de km<sup>2</sup>. (Ferri 1977)

Segundo Myers *et al.* (2000), atualmente somente 20% do cerrado permanece intacta e outras estimativas apontam para um desmatamento alarmante de cerca de 50% (Alho e Martins 1995 e Ratter *et al.* 1997). Quando analisado conjuntamente com o pantanal cerca de 17% é de áreas fortemente antropizadas, 17% de antropizadas, 49% com cobertura não mais de cerrado ou pantanal (cursos de água e áreas antrópicas) e 17% de áreas naturais (Ações 1999, Biodiversidade 2002) (Walter 2006).

O cerrado, situado entre 5° e 20° de latitude Sul e de 45° a 60° de longitude Oeste (Sano *et al.* 2008), sendo maior parte de sua área localizada no Planalto Central do Brasil é o segundo maior bioma do país em área, apenas superado pela floresta amazônica. (Sano *et al.* 2008) Ocorre em altitudes que variam de cerca de 300 m a mais de 1600 m (Sano *et al.* 2008). No bioma, predominam os latossolos vermelhos ou amarelos, tanto em áreas sedimentares quanto em terrenos cristalinos, ocorrendo ainda solos concrecionários em grandes extensões (Sano *et al.* 1998, 2008, Pinto *et al.* 1994).

A abrangência do cerrado compreende os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Há ainda áreas disjuntas nos estados do

Amapá, Amazonas, Pará e Rorâima e na forma de pequenas “ilhas” no Paraná (Sano *et al.* 2008) (Figura 2).



Figura 2: Mapa apresentado em Furley (1999) com a distribuição das fisionomias vegetais do Brasil. 1: Cerrado, 2: Chaco, 3: Mata Atlântica, 4: Pantanal e 5: Caatinga.

Quanto ao clima, o cerrado se caracteriza pela presença de invernos secos e verões chuvosos, classificado como Aw de Köppen (tropical chuvoso). A precipitação média anual encontra-se em torno de 1500 mm, variando de 750 mm a 2000 mm. As chuvas concentram-se (chegando a corresponder a 90% da precipitação) de outubro a março e a temperatura média do mês mais frio é superior a 18 °C (Sano *et al.* 2008, Silva *et al.* 1996). A ocorrência de duas estações bem definidas caracteriza a distribuição concentrada das chuvas em toda região, com influência direta sobre a vegetação. O clima também representa uma causa temporal na origem dessa vegetação, pois as

chuvas ao longo do tempo geológico intemperizaram os solos, deixando-os pobres em nutrientes essenciais (Sano *et al.* 2008).

Entre os diversos tipos de solo, o latossolo é o que mais ocorre nos cerrados (46%). Morfológicamente são solos minerais, não hidromórficos, com mais de 2 m de profundidade, com cores de vermelho escuro a amarelado. Fisicamente são caracterizados por alta permeabilidade de água e microestrutura forte (gera comportamento semelhante ao de solos arenosos) apesar de possuir tanta água quanto as terras roxas. Quimicamente mais de 95% dos latossolos do cerrado são distróficos e ácidos, com pH entre 4,0 e 5,5 (Sano *et al.* 1998).

A porção arbórea da vegetação é composta por plantas lenhosas com uma aparência característica. Os troncos e galhos de árvores e de arbustos de caule grosso são, na maior parte, torcidos, dando uma aparência tortuosa à vegetação. A casca é usualmente grossa, corticosa e com arestas. As folhas e folíolos de plantas lenhosas do cerrado geralmente são um pouco grandes. Folhas de cerrado, seja sua espessura fina ou grossa, geralmente são duras e tesas e quebram quando dobradas; sua superfície é lisa e cerosa, áspera ou pilosa. Na face inferior, as nervuras primárias e secundárias e, frequentemente, as terciárias e quaternárias destacam-se, formando arestas duras. Na maioria das espécies a cor da folha é mais clara ou mais cinzenta que as de florestas mesofíticas. Esta coloração é devida à estrutura do tecido e à cutícula espessa (Goodland & Ferri 1979).

Além de estudos morfológicos e anatômicos, filogenias têm mostrado que as linhagens de plantas que ocorrem no cerrado estão fortemente associadas a adaptações ao fogo, o que não é encontrado nas floras de biomas adjacentes (Simon *et al.* 2009).

### **3. O trabalho atual**

Uma vez que a última revisão do gênero *Kielmeyera* (Saddi 1982) indicou várias dúvidas com relação às sinonimizações e chegou a criar inúmeras categorias infraespecíficas na tentativa de “organizar” a ampla variação da espécie *K. coriacea* (subespécie, variedade, grupo) e é conhecido o fato de que *K. coriacea* hibridiza com a espécie supostamente mais próxima (*K. grandiflora* (Wawra) Saddi) (Caddah 2009, Caddah *et al.* 2012), torna-se interessante estudar se tais variações resultariam somente de grande capacidade plástica da espécie ou relacionam-se à diversidade genética.

Esta investigação torna-se possível através do estudo da genética populacional associada a estudos taxonômicos (envolvendo coletas e análises de coleções de herbários) e anatômicos (no caso, das folhas). Estudos de anatomia foliar têm se mostrado muito importantes para a compreensão da morfologia característica das plantas do cerrado e para resolução de complexos de espécies (ver capítulo 2), enquanto os marcadores moleculares permitem uma abordagem alternativa à tradicional (estudos de morfologia) sobre distribuição da diversidade em um complexo de espécies (ver capítulo 3). Os resultados conjuntos fornecem uma base melhor para a compreensão do que atualmente é conhecido como “complexo *Kielmeyera coriacea*”.

#### **4. Obejetivos**

Os objetivos gerais do presente trabalho foram:

- utilizar dados de genética, anatomia e morfologia para compreensão do “complexo *K. coriacea*”;
- determinar a forma como a variação genética está estruturada em populações de *K. coriacea* e identificar possíveis híbridos.

Os objetivos específicos foram:

- estudar a anatomia estrutural foliar comparativa das duas subespécies de *K. coriacea*, buscando fornecer uma descrição e encontrar caracteres que possibilitem melhor delimitação dos táxons;
- através da genética populacional, obter informações para compreensão do complexo;
- comparar as principais descrições para os táxons estudados e compreender a circunscrição atual dos táxons considerados pertencentes ao complexo, alterando-a caso a hipótese de que as duas espécies incluídas em *K. coriacea* constituem espécies distintas seja confirmada.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AÇÕES prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. 1999. Brasília: Conservation International do Brasil/FUNATURA/UnB/Fundação Biodiversitas/MMA. 26 p. il. (Inclui 1 mapa “Prioridades para a conservação do Cerrado e do Pantanal”).

- ALHO, C.J.R. & MARTINS, E.S. (ed.). 1995. De grão em grão, o cerrado perde espaço: Cerrado – impactos do processo de ocupação. Brasília: WWF, PRÓ-CER. 66 p. (Documento para discussão).
- ALVIM, P.T. & ARAÚJO, W.A. 1952. Soil as an ecological factor in the development of a vegetation the central plateau of Brasil. Turrialba. 2: 153-160.
- ARENS, K., FERRI, M.G. & COUTINHO, L.M. 1958. Papel do fator nutricional na economia d'água de plantas do cerrado. Revista de Biologia. (Lisboa). 1: 313-324.
- CADDAH, M.K. 2009. Estudos Taxonômicos sobre o complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- CADDAH, M.K., MAYER, J.L.S., AMARAL, M.C.E. & BITTRICH, V. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. Botanical Journal of the Linnean Society. 168: 101-115.
- CARDOSO DA SILVA, J.M & BATES, J.M. 2002. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. BioScience. 52(3): 225-234.
- COLE, M.M. 1960. Cerrado, Caatinga and Pantanal; the distribution and origin of the savanna vegetation of Brazil. Geogr. J. 61: 3-14.
- COLE, M.M. 1986. The savannas: biogeography and geobotany. London. Academic Press. 438 p.
- COUTINHO, L.M. 1978. O conceito de Cerrado. Revista Brasileira de Botânica. 1 (1): 17-23.
- DIAS, B.F.S (coord.). 1996. Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis. Fundação Pró-Natureza, Brasília. p.11-25.
- DURIGAN, G., RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S., SIQUEIRA, M.F. & FRANCO, G.A.D.C. 2003a. Padrões fitogeográficos do cerrado paulista sob uma perspectiva regional. Hoehnea. 30 (1): 39-51.
- DURIGAN, G., SARAIVA, T.R., GARRIDO, L.M.A.G., GARRIDO, M.A. de O. & PECHE-FILHO, A. 1987 Fotissociologia e evolução da densidade da vegetação do Cerrado, Assis, SP. Boletim Técnico do Instituto Florestal. São Paulo. 41 (1): 59-78.
- DURIGAN, G., SIQUEIRA, M.F., FRANCO, G.A.D.C., BRIDGEWATER, S. & RATTER, J.A. 2003b. The vegetation of priority areas for cerrado conservation in São Paulo state, Brazil. Edinburgh Journal of Botany. 60 (2): 217-241.
- EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. The Botanical Review. 38 (2): 201-341.

- EITEN, G. 1978. A sketch of vegetation of Central Brasil. In: Congresso Latino-americano de Botânica, 2 - Congresso Nacional de Botânica, 29. Anais, Resumo dos trabalhos. Brasília e Goiânia. p. 137.
- FELFILI, J.M., SILVA JÚNIOR, M.C. 1993. A comparative study of cerrado (*sensu stricto*) vegetation in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 9: 277-289
- FERRI, M.G. 1944. Transpiração de plantas permanentes dos cerrados. *Bol. FFCL USP*. 41 (4): 159-224.
- FERRI, M.G. 1977. Ecologia dos cerrados. In: Simpósio sobre o cerrado, 4: bases para utilização agropecuária. 1976. Brasília, DF. Anais. Belo Horizonte: Itatiaia, São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo. p 15-36. (Reconquista do Brasil, 38).
- FERRI, M.G. 1943. Observações sobre Lagoa Santa. *Ceres*. 4: 1-16.
- FURLEY, P.A. 1999. The nature and diversity of neotropical savanna vegetation with particular reference to the Brazilian cerrados. *Global Ecology and Biogeography*. 8: 223–241.
- GOODLAND, R. & FERRI, M.G. 1979. *Ecologia do Cerrado*. Belo Horizonte: Itatiaia. 193p.
- GOODLAND, R. 1969. An ecological study of the cerrado vegetation of south-central Brasil. McGill Univ. Montréal. p. 224.
- GOODLAND, R. 1971a. The cerrado oxisols of the Triângulo Mineiro, Central Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 43: 407-414.
- GOODLAND, R. 1971b. A physiognomic analysis of the “cerrado” vegetation of Central Brasil. *Journal of Ecology*. 59 (2): 411-419.
- HUECK, K. 1972. *As florestas da América do Sul*. Brasília. Editora da Universidade de Brasília/ São Paulo: Polígono. 466p. il.
- JACOMINE, P.K.T. 1969. Descrição das características morfológicas, físicas, químicas e mineralógicas de alguns perfis de solos sob vegetação de cerrado. Rio de Janeiro. Equipe de Pedologia e Fertilidade do Solo. *Boletim Técnico*. 11, 125p.
- KUHLMANN, E. 1951. Aspectos gerais da vegetação do alto do São Francisco. *Revista Brasileira de Geografia*. 13 (3): 465-472.
- MACHADO, R.B., RAMOS NETO, M.B, PEREIRA, P.G.P, CALDAS, E.F., GOLÇALVES, D.A., SANTOS, N.S., TABOR, K. & STEININGER, M. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional. Brasília, DF, Brasil.

MARTIUS, C.F.Ph. von, EICHLER, A.G. & URBAN, I. 1840-1906. Flora Brasiliensis. V. 1. Pars 1. MARTIUS, C.F.Ph. de Tabulae physiognomicae Brasiliae Regiones Iconibus Expressas Descripsit Duque Vegetatione Illius Terrae Uberius. p. 1-110.

MARTIUS, C.F.Ph. von. 1943. A fisionomia do reino vegetal no Brasil. Arquivos do Museu Paranaense. 3: 239-271. (Tradução de E. Niemeyer e C. Stellfeld de “Die physiognomie des pflanzenreiches in Brasilien”. Sitz. Akad. Wiss. München, 1824).

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G.A.B. da & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. 403: 853-858.

OLIVEIRA-FILHO, A.T., SHEPHERD, G.J., MARTINS, F.R. & STUBBLEBINE, W.H. 1989. Environmental Factors Affecting Physiognomic and Floristic Variation in an Area of Cerrado in Central Brazil. JOURNAL OF Tropical Ecology. 5 (4): 413-431

PENNINGTON, R.T., RATTER, J.A. & LEWIS, G.P. (eds.). 2005. Neotropical savannas and dry forests: Plant diversity, biogeography and conservation. Boca Raton. CRC Press.

PINTO, M.N. (ed.). 1994. Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. 2ed. Brasília: UnB/SEMATEC. 681 p.

RACHID, M. 1947. Transpiração e sistemas subterrâneos da vegetação de verão dos campos Cerrados de Emas. Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo. Botânica. 80 (5):5-140.

RATTER, J.A., BRIDGEWATER, S., & RIBEIRO, J.F.. 2003. Analysis of the Floristic Composition of the Brazilian Cerrado Vegetation III: Comparison of the Woody Vegetation of 376 Areas. Edinburgh Journal of Botany. 60 (1): 57-109.

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. 1997. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. Annals of Botany. 80: 223-230.

RAWITSCHER, F. & RACHID, M. 1946. Troncos subterrâneos de plantas brasileiras. Anais da Academia Brasileira de Ciências 18:261-280.,

RAWITSCHER, F. 1942. Algumas noções sobre a transpiração e o balanço d'água de plantas brasileiras. An. Acad. Bras. Ciênc. 14: 7-36.

RAWITSCHER, F., FERRI, M.G. & RACHID, M. 1943. Profundidade dos solos e vegetação em campos cerrados do Brasil Meridional. Anais da Academia Brasileira de Ciências 15:267-294.

RIZZINI, C.T. 1970. Árvores e arbustos de cerrado. Rodriguésia. 26 (38): 63-77.

SADDI, N. 1982. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.

- SADDI, N. 1986. Novos táxons intraespecíficos no gênero *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). *Bradea*. 4: 281-286.
- SANO, S.M., ALMEIDA, S.P. & RIBEIRO, J.F. (eds.). 2008. Cerrado: ecologia e flora. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. V. 1. 406p.
- SANO, S.M., ALMEIDA, S.P. (ed.). 1998. Cerrado: ambiente e flora. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. 556 p.
- SARMIENTO, G. 1983. The savannas of Tropical America. In: Bourlière, F. (ed.). *Ecosystems of the world 13: tropical savannas*. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier Scientific Publishing Company. p. 245-288.
- SILVA, G. T., SATO, M. N. & MIRANDA, H. S. 1996. Mortalidade de plantas lenhosas em um campo sujo de cerrado. In: III Congresso de Ecologia do Brasil. Brasília. Impacto de Queimadas em Áreas de Cerrado e Restinga. Brasília: ECL/UNB, 1996. p. 93-101.
- STEVENS, P.F. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. November 2011. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- WAIBEL, L. 1948. Vegetation and land use in the Planalto Central of Brasil. *Geogr. Rev.* 38: 529-554.
- WALTER, B.M.T. 2006. Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas. Tese de doutorado, Universidade de Brasília.
- WARMING, J.E.B. 1892. Lagoa Santa. *Det. Kongel. Danske Vidensk. Selskabs. Skrifter*. R. 6.B. 6.3:153-488.

# **CAPÍTULO 1**

**Questões taxonômicas envolvendo o complexo  
*Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.**

## INTRODUÇÃO

### 1. Contextualização taxonômica do gênero *Kielmeyera* Mart. & Zucc.

#### 1.1. Caracterização geral

A ordem Malpighiales apresenta cerca de 7,8 a 8% da diversidade das eudicotiledôneas (Magallón *et al.* 1999, Korotkova *et al.* 2009) e 6% das angiospermas (Korotkova *et al.* 2009). Sua circunscrição atual inclui 39 famílias com aproximadamente 16000 representantes (APG II 2003, APG III 2009, Barkman *et al.* 2004). A composição desta ordem foi considerada uma das descobertas mais surpreendentes de estudos de filogenia molecular (Chase *et al.* 1993, Savolainen *et al.* 2000 a e b, Soltis *et al.* 2000). Seus representantes incluem plantas taloides aquáticas (Podostemaceae), holoparasitas (Rafflesiaceae) e suculentas que lembram cactáceas (Euphorbiaceae) (Wurdack & Davis 2009).

A composição da ordem mudou muito desde sua “circunscrição moderna” por Chase *et al.* (1993) e numerosos estudos utilizando múltiplas regiões gênicas comprovaram sua monofilia (Chase *et al.* 1993, 2002, Fay *et al.* 1997, Litt & Chase 1999, Soltis *et al.* 1999, 2000, 2003, 2007, Savolainen *et al.* 2000 a e b, Cameron *et al.* 2001, Davis *et al.* 2001, 2005 a e b, 2007, Kita & Kato 2001, Wurdack 2002, Hilu *et al.* 2003, Davis & Chase 2004, Wurdack *et al.* 2004, 2005, Samuel *et al.* 2005, Kathriarachchi *et al.* 2005, Tokuoka & Tobe 2006, Zang & Simmons 2006, Tokuoka 2007, 2008, Zhu *et al.* 2007, Korotkova *et al.* 2009). Porém mesmo com esta grande quantidade de estudos, as relações familiares continuam pouco compreendidas, de modo que a topologia interna é pela maior parte uma politomia, tornando as Malpighiales um dos maiores clados das angiospermas com baixo grau de resolução interna (Wurdack & Davis 2009). A dificuldade aumenta quando são considerados os padrões de endemismo continental, a inexistência de caracteres não genéticos para unir seus representantes, a descoberta de que várias das famílias tradicionalmente reconhecidas pertencentes às Malpighiales revelaram-se polifiléticas e a hipótese de rápida radiação do clado iniciada há 114 milhões de anos, com a divergência relativamente recente de Hypericaceae e Podostemaceae, há cerca de 76 milhões de anos (Stevens 2001 em diante, Soltis *et al.* 2005, Davis *et al.* 2005b).

Ainda assim algumas características são particularmente comuns aos representantes das Malpighiales como estômatos paracíticos, gineceu frequentemente tricarpelar, pedicelos articulados e perda do gene *atpF* (Stevens 2001 em diante).

Entre os clados presentes na ordem há o denominado clado clusioide, composto atualmente por cinco famílias (Clusiaceae s.s., Calophyllaceae, Hypericaceae, Podostemaceae e Bonnetiaceae), cerca de 94 gêneros e aproximadamente 1900 espécies (Ruhfel *et al.* 2011). Este clado pode ser citado como um exemplo de grupo que durante muito tempo foi um dos representantes das incertezas dentro de Malpighiales.

As clusioides são morfologicamente heterogêneas e ecologicamente diversas, ocorrendo em ambientes extremamente variados (Ruhfel *et al.* 2011). O histórico do tratamento das famílias exemplifica a dificuldade na circunscrição, com casos como Cronquist (1981) separando as famílias em ordens e subclasses diferentes e distantes e Takhtajan (1997), desconsiderando os dados moleculares de Chase (1993), e outros pesquisadores considerando alguns dos táxons relacionados a Theaceae s.l. (atualmente na ordem Ericales, APG III 2009).

Estudos que incluíram dados moleculares (Savolainen *et al.* (2000 b), Soltis *et al.* (2000), Gustafsson *et al.* (2002) e Wurdack & Davis (2009)) permitiram uma melhor compreensão das relações internas, porém o entendimento no nível desejado só foi alcançado recentemente quando Ruhfel e colaboradores (2011) obtiveram grande suporte para o clado e estabeleceram suas relações internas. Para tal, uma nova circunscrição das famílias foi necessária, permitindo o reconhecimento de sinapomorfias para o clado (Ruhfel *et al.* 2011). Muitos estudos ainda serão necessários uma vez que as clusioides aparentemente apresentam elevada taxa de evolução molecular (Adams *et al.* 2002, Davis *et al.* 2007).

As relações entre alguns gêneros ainda são desconhecidas e supões-se que alguns deles não sejam monofiléticos (*Hypericum*, *Garcinia* e *Ledermannia* s.s.; Stevens 2007, Sweeney 2008, Thiv *et al.* 2009 e Nürk & Blattner 2010), enquanto a monofilia de todos os gêneros de Calophyllaceae até o momento é considerada válida (Ruhfel *et al.* 2011), mostrando que as relações internas ainda não estão bem estabelecidas.

Durante muito tempo grande parte dos gêneros atualmente pertencentes a Calophyllaceae encontraram-se incluídos em Clusiaceae Lindl. s.l. (excluindo ou incluindo Hypericaceae), também conhecida como Guttiferae Juss. Tradicionalmente, as Clusiaceae s.l. incluem aproximadamente 1090 espécies distribuídas em 27 gêneros e

com distribuição pantropical. No Brasil ocorrem 18 destes gêneros e cerca de 150 espécies (Souza & Lorenzi 2008).

As Clusiaceae s.l. eram divididas, baseadas em caracteres morfológicos, em duas subfamílias, cuja monofilia foi comprovada por estudos moleculares recentes: Kielmeyeroideae, com 14 gêneros, incluindo as tribos Calophylleae e Endodesmieae; e Clusioideae, com 13 gêneros, incluindo as tribos Clusieae, Garcinieae e Symphonieae (Metcalf & Chalk 1950, Weitzman & Stevens 1997, Notis 2004, Stevens 2007).

A monofilia de Kielmeyeroideae foi confirmada por Notis (2004) através de estudos filogenéticos com caracteres moleculares (genes *rbcL*, *matK* e ITS) aliados a dados morfológicos. Essa subfamília é amplamente distribuída entre os trópicos, sendo os gêneros *Calophyllum*, *Neotatea*, *Marila*, *Mahurea*, *Clusiella*, *Kielmeyera*, *Caraipa* e *Haploclathra* encontrados no novo mundo; *Poeciloneuron*, *Mesua* e *Kayea* no velho mundo e *Mammea* e *Calophyllum* apresentam algumas espécies no novo mundo, mas a grande maioria encontra-se de Madagascar ao Pacífico (Notis 2004).

A subfamília Kielmeyeroideae apareceu nos cladogramas de Davis e colaboradores (2009) como grupo irmão de Hypericaceae + Podostemaceae enquanto Clusioideae ficou próxima de Bonnetiaceae. As opções apresentadas pelos autores para reconhecimento de um grupo monofilético seriam a inclusão de todas as clusíoides em Clusiaceae s.l., o que criaria um grupo muito grande e extremamente heterogêneo, ou o restabelecimento de Calophyllaceae como uma família composta pelos gêneros pertencentes a Kielmeyeroideae. Ao optar pela segunda opção, a família Calophyllaceae foi aceita com 14 gêneros e aproximadamente 476 espécies (Stevens 2007, Wurdack & Davis 2009).

Notis (2004) forneceu boas hipóteses a respeito das relações entre os gêneros em Calophyllaceae. O clado composto por *Caraipa*, *Haploclathra*, *Kielmeyera*, *Clusiella*, *Mahurea* e *Marila* apresentou poucas potenciais sinapomorfias morfológicas como cálice com prefloração quincuncial, corola pentâmera, gineceu tricarpelar, placentação axilar ou parietal e posição central do óvulo no lóculo. Já o clado composto por *Kielmeyera*, *Caraipa* e *Haploclathra* teve como possíveis caracteres sinapomórficos a ocorrência de indumento de tricomas pluricelulares, folhas alternas (exceto em *Haploclathra*), cotilédones cordados e ausência de drusas ou cristais. Para *Kielmeyera* a autora sugeriu que a presença de mais de 15 óvulos por carpelo e semente com espessura da ala sendo de duas camadas de células que envolvem completamente a semente e sem tecido vascular.

Além das possíveis sinapomorfias, Notis (2004) evidenciou a utilidade de caracteres anatômicos do grupo em estudos filogenéticos e através de observações apenas de folhas e pecíolos 16 caracteres foram descobertos e destes, 13 foram informativos, o que é de grande importância dada a grande semelhança entre espécies no caso de alguns gêneros como *Kielmeyera*. A importância do uso de estudos anatômicos pela sistemática, especialmente após estudos detalhados de morfologia, já havia sido apontada por Scotland e colaboradores (2003).

As antigas Kielmeyeroideae, atuais Calophyllaceae podem ser divididas em duas tribos: Calophylleae (grande, pantropical) e Endodesmieae (pequena e restrita a África tropical). A subfamília apresentou diversos caracteres biologicamente muito interessantes, cuja evolução deve ainda ser investigada, como o sistema de canais laticíferos, a presença, a forma e a posição das glândulas nas anteras, a organização do androceu incluindo ou não a presença de estaminódios e os diferentes tipos de frutos que podem ser secos ou carnosos, deiscentes ou não (Notis 2004, Wurdack & Davis 2009, Ruhfel *et al.* 2011).

Muitos dos representantes de Calophyllaceae são economicamente importantes como *Mammea americana* L., cujo fruto é comestível e consumido no Caribe (Notis 2004), a madeira de espécies de *Calophyllum*, *Haploclathra* e *Kayea* é utilizada em construções (Stevens 1980, Vasquez 1993), o óleo de frutos de *Calophyllum* pode ter utilidade medicinal ou como combustível em lamparinas (Stevens 1980). *Kielmeyera coriacea* gera um extrato testado para fins medicinais como antidepressivo e antitumoral entre outras possíveis ações (Caddah *et al.* 2012), *Calophyllum brasiliense* Cambess. também apresenta um extrato em fase de teste para atividade antitumoral (Mesquita *et al.* 2009) e *C. lanigerum* Miq. Tem sido testado no tratamento da AIDS (Greer 2001).

## 1.2. Histórico do gênero (modificado de Saddi 1982)

Um grupo de plantas foi classificado como pertencente à família Bonnetiaceae e agrupado no gênero *Kielmeyera* por Martius e Zuccarini, em 1825, na obra “Flora Botanische Zeitung” em homenagem a C. F. de Kielmeyer, conselheiro de estado e patrono da botânica. Curtas descrições e diagnoses foram apresentadas para as espécies: *K. rosea*, *K. petiolaris*, *K. coriacea*, *K. variabilis* e *K. corymbosa*. As ilustrações foram indicadas, mas não fornecidas.

Em 1826, Martius forneceu descrições mais detalhadas e ilustrações das espécies mencionadas na obra “Nova Genera et Species Plantarum”, porém estas estavam agora incluídas na família Ternstroemiaceae.

É importante mencionar que, em 1825, Vellozo descreveu o gênero *Martinieria* na obra “Flora Fluminensis” publicada em 1825, mas o texto foi disponibilizado apenas em 1829 e as ilustrações em 1831. Por isso, esse gênero não tem prioridade sobre *Kielmeyera* e a espécie *Martinieria arborea* Vell. foi considerada por Saggi um sinônimo de *Kielmeyera coriacea*.

Em 1827, todas as espécies do gênero *Kielmeyera* foram transferidas para o gênero Bonnetia por Sprengel. No ano seguinte A. Saint-Hilaire descreveu *K. speciosa* na família Ternstroemiaceae, com duas variedades: *major* e *minor*.

O primeiro grande trabalho considerando o gênero *Kielmeyera* (Ternstroemiaceae) foi realizado por Cambessèdes em 1828, o qual publicou na “Flora Brasiliae meridionalis” as novas espécies: *K. falcata*, *K. rubriflora*, *K. neriifolia*, *K. hemifusa*, *K. tomentosa* e *K. excelsa*. Além disto, foi proposta a variedade *pauciflora* (não reconhecida por Saggi) para *K. corymbosa*.

Em 1830, Pohl descreveu novas espécies no gênero: *K. angustifolia*, *K. oblonga*, *K. pumila* e *K. microphylla*. E na mesma década, Spach (1835) revisou a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Kielmeyera*.

Em 1842, Casaretto propôs *K. membranacea*. Choisy, em 1855, listou a maioria das espécies pertencentes ao gênero e propôs *K. argentea* e *K. rugosa*.

A primeira revisão do gênero foi realizada por Wawra (1886) no tratamento das Ternstroemiaceae para a “Flora brasiliensis”. O autor reconheceu 17 espécies (incluindo *K. gracilis*) arranjadas em quatro seções. Também sugeriu variedades, sendo parte delas propostas informalmente. Wawra utilizou a presença de tricomas no ovário e no perianto para a criação das seções: *Rosae*, *Corymbosae*, *Coriaceae* e *Petiolares*. E para *K. coriacea*, pela primeira vez, foram reconhecidas variedades: var. “*typica*” (= var. *coriacea*); var.  $\alpha$ . *oblonga*, baseada em *K. oblonga* Pohl, uma espécie com flores róseas; e var.  $\beta$ . *grandiflora*, proposta sobre o nome *K. grandiflora*, supostamente sugerido por Saint-Hilaire a uma coleta de Pohl (Pohl 110, in schaed: W).

Em 1888, Engler transferiu o gênero *Kielmeyera* para a família Guttiferae, com a proposição da subfamília Kielmeyeroideae e da tribo *Kielmeyerae*.

Em 1895, Moore descreveu *K. amplexicaulis* (MT) em Ternstroemiaceae.

Rusby propôs a primeira espécie de *Kielmeyera* fora do Brasil: *K. paniculata* (da Bolívia) e Chodat e Hassler reportaram a ocorrência do gênero no Paraguai e propuseram *K. coriacea* var. *brevisepala*.

Em 1905, Glaziou apresentou uma lista das espécies de *Kielmeyera* coletadas no Brasil central. A variedade *nervosa* de *K. coriacea* não teve descrição (nom. nud.).

A revisão mais recente foi realizada por Saddi (1982) e reconheceu 47 espécies para o gênero.

### 1.3. Situação atual do gênero

Atualmente o gênero *Kielmeyera* Mart. & Zucc. pertence à família Calophyllaceae e compreende cerca de 47 espécies distribuídas principalmente no Brasil, em regiões de baixa altitude (Saddi 1982, Stevens 2001 em diante). O gênero distingue-se pelas folhas alternas e pelos frutos capsulares lenhosos, 3-valvares, com numerosas sementes aladas (Bittrich 2003, Stevens 2001 em diante). Ele é considerado grupo irmão do clado *Caraipa* + *Haploclathra* (Notis 2004), gêneros que ocorrem na região amazônica e nas Guianas (Kubitzki & Holst 1998, Ruhfel *et al.* 2011).

Pertencem ao gênero *Kielmeyera* árvores, geralmente baixas, arvoretas, arbustos ou subarbustos, ramificados ou não; xilopódio e tricomas (simples ou ramificados) podem ser presentes ou ausentes. São plantas hermafroditas ou raramente andromonoicas, que apresentam estruturas secretoras (tanto canais de látex como glândulas) de origem esquizogênica. As folhas dispõem-se de maneira espiralada, variam de cartáceas a coriáceas, têm venação reticulada, sendo as nervuras secundárias comumente distantes entre si. Apresentam inflorescências terminais cimosas ou racemosas, com número de flores variando de três a muitas, podendo mais raramente ocorrer flores solitárias. As flores geralmente são bissexuais (raramente flores masculinas na mesma planta), com perianto pentâmero e de coloração branca, rósea ou arroxeadada. A prefloração do cálice é quincuncial e da corola imbricada contorta, com pétalas geralmente assimétricas. Apresentam estames numerosos, com anteras tendo de 1 a 2,5mm de comprimento, loceladas ou não, frequentemente apresentam glândulas características no ápice das anteras; a liberação de pólen pode ocorrer em tétrades. O ovário é 3-carpelar, com numerosos óvulos por lóculo, pode apresentar ou não indumento; o estigma é expandido. Os frutos são cápsulas septícidias, com muitas sementes aladas (Bittrich 2003, Stevens 2007).

## 2. Histórico de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

### 2.1. “Linha do tempo”

Esta breve linha do tempo tem o intuito de apresentar as principais descrições de táxons que foram, em algum momento, relacionados a *Kielmeyera coriacea*. Deste modo, somente espécies atualmente sinonimizadas foram mencionadas; o restante encontra-se no item 1.2.

1825 – Descrição da espécie na obra “Flora Botanische Zeitung” por Martius e Zuccarini, porém com poucas informações e a obra é de difícil acesso devido ao idioma (alemão).

1826 – Descrição mais detalhada e com ilustrações em “Nova Genera et Species Plantarum”.

1828 – Publicação das espécies *K. falcata* e *K. tomentosa* por Cambessèdes na “Flora Brasiliae meridionalis”.

1830 – Pohl: descreve *K. oblonga* e *K. microphylla*.

1886 – Wawra cria as seções *Roseae*, *Corymbosae*, *Coriaceae* e *Petiolares* e reconhece três variedades para *K. coriacea*: var. “*typica*” (= var. *coriacea*), var.  $\alpha$ . *oblonga* (baseada em *K. oblonga* Pohl, uma espécie com flores róseas) e var.  $\beta$ . *grandiflora* (proposta sobre o nome *K. grandiflora*, supostamente sugerido por Saint-Hilaire a uma coleta de Pohl (Pohl 110, in schaed: W)).

1895 – Chodat e Hassler reportam a ocorrência do gênero no Paraguai e propõe *K. coriacea* var. *brevisepala*.

1905 – Glaziou lista as espécies de *Kielmeyera* coletadas no Brasil central. A variedade *nervosa* de *K. coriacea* não teve descrição.

1982 – Saddi revisa o gênero *Kielmeyera* e propõe 2 subespécies e 7 variedades para *K. coriacea*, além de sinonimizagens. Estas alterações serão tratadas posteriormente.

2009 – Caddah iniciou estudos anatômicos e populacionais no “complexo *K. coriacea*”, fornecendo indícios de problemas na atual circunscrição dos táxons pertencentes ao complexo.

## 2.2. O trabalho de Saddi (1982), as inúmeras variedades e a “criação de um complexo”

A revisão mais recente para o gênero foi realizada por Saddi (1982), baseada principalmente em caracteres morfológicos. A partir de seus estudos, ele descreveu diversas espécies novas e propôs novas classificações infragenéricas e infraespecíficas (1984a, 1984b, 1984c, 1984d, 1984e, 1984f, 1986, 1987a, 1987b).

Saddi (1982) dividiu a seção *Coriaceae* em três séries, sendo a série *Coriaceae* distinta das demais pelas folhas coriáceas, com base da nervura central expandida e nervura central proeminente na face abaxial, pelo hábito arbóreo/arbustivo, caule fortemente suberoso e xilopódio ausente.

Apenas duas espécies (com a sinonimização de várias espécies em *K. coriacea*) foram incluídas nesta série: *K. coriacea* (incluiu *K. microphylla*, *K. tomentosa*, *K. falcata* e *K. oblonga* como sinônimos) e *K. grandiflora*, novo status para *K. coriacea* var.  $\beta$  *grandiflora* Wawra. Ao elevar a variedade *grandiflora* de Wawra ao nível específico, Saddi (1982) menciona que *Kielmeyera grandiflora* seria distinta de *K. coriacea* pela venação foliar com as nervuras secundárias uniformemente paralelas (sem reticulações) e próximas entre si (a distância entre as nervuras secundárias seria menor que 3mm) e não arqueando na margem ou apenas indistintamente.

Segundo Caddah (2009) a aparência da maior densidade das nervuras secundárias em *K. grandiflora* deve-se ao desenvolvimento mais forte de nervuras intersecundárias e o padrão de nervação lateral nem sempre serve como caráter distintivo entre as duas espécies. Em material herborizado, a autora considerou a distinção entre essas duas espécies muito difícil e observou que a cor da flor também não se preserva. Os demais caracteres morfológicos avaliados por Caddah (2009) apresentam estados intermediários, possivelmente devido à possibilidade de introgressão entre as duas espécies. Assim, não se admira que o próprio Saddi tenha identificado espécimes incorretamente e, aparentemente, muitas vezes desistiu de identificar espécimes depositados nos herbários que visitou.

Saddi inclui ainda em *K. coriacea* o sinônimo *Martiniera arborea* de Vellozo (data efetiva de publicação é 1829), cujo tipo é representado apenas por uma ilustração da Flora fluminensis (Vellozo 1829). No entanto, nem a prancha nem a breve descrição da espécie deixam claro se a planta se trataria de *K. coriacea* ou *K. grandiflora*. *Kielmeyera hemifusa*, que havia sido incluída na seção *Coriaceae* por Wawra, foi incluída por Saddi também na seção *Coriaceae*, mas na série *Corymbosae* (Wawra) Saddi.

Para a espécie *K. coriacea*, Saddi reconheceu sete variedades distribuídas entre duas subespécies: *K. coriacea* subsp. *coriacea*, com quatro variedades, e *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (antiga *K. tomentosa* Cambess.), com três variedades (ver adiante).

Em uma investigação de quatro populações do estado de São Paulo pertencentes ao complexo *K. coriacea* Caddah (2009) relatou a dificuldade do uso de categorias infraespecíficas, mencionando como sendo raro o reconhecimento de duas diferentes categorias infraespecíficas para a mesma espécie. Na divisão proposta por Saddi (em sua tese de 1982 e na publicação válida dos nomes), o autor considerou as subespécies como populações atribuídas a uma espécie, capazes de serem distintas por um conjunto de caracteres morfológicos e distribuição geográfica desigual ou apenas parcialmente sobreposta. Já as variedades seriam reconhecidas por diferenças morfológicas pequenas em caracteres muitas vezes contínuos, com as respectivas populações sendo muitas vezes simpátricas.

É notável Saddi (1982) ter incluído *K. tomentosa* como uma subespécie de *K. coriacea*, uma vez que esses táxons diferem em diversos caracteres descontínuos (ver abaixo). As variedades que Saddi atribuiu a essas duas subespécies, por outro lado, são reconhecidas frequentemente com base em caracteres quantitativos, possivelmente contínuos e de interpretação subjetiva (p.ex., folhas tomentosas x folhas tomentulosas a esparsamente pilosas; nervuras pouco visíveis x nervuras fortemente visíveis, etc.), além de tamanho e forma das folhas e do número de flores na inflorescência e comprimento do pedúnculo. Como Saddi (1982) refere, para diversas variedades, um número muito restrito de espécimes, pode ser que a análise de um número maior de exemplares revele que esses caracteres são de fato contínuos e não justificariam o reconhecimento de todas essas categorias infraespecíficas espécie.

*Kielmeyera coriacea* subsp. *coriacea* senso Saddi é caracterizada pelas folhas glabras e pelas nervuras secundárias sutis, e, como mencionado acima, é constituída por quatro variedades distintas entre si por tamanho e forma das folhas e das inflorescências e pela presença ou ausência de indumento no pedicelo das flores: *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *coriacea* (inclui *K. oblonga* Pohl, *K. coriacea* var. *a oblonga* Wawra e *K. coriacea* Cambess.), *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *microphylla* (Pohl) Saddi (antiga *K. microphylla* Pohl), *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *guianensis* Saddi e *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *glabripes* Saddi.

Já *Kielmeyera coriacea* subsp. *tomentosa* (Cambess.) Saddi é caracterizada por folhas com indumento e nervuras secundárias proeminentes. Esta subespécie inclui três

variedades: *K. coriacea* subsp. *tomentosa* var. *tomentosa*; *K. coriacea* subsp. *tomentosa* var. *intermedia* Saddi; e *K. coriacea* subsp. *tomentosa* var. *pseudotomentosa* Saddi, distintas pelo tamanho do pecíolo, pelo grau de proeminência das nervuras e pela densidade de tricomas nas folhas.

Saddi (1986) admite, no entanto, que algumas de suas variedades poderiam vir a assumir o status de espécie por meio de estudos mais aprofundados. Mas fica pouco claro porque ele teria reduzido a espécie *K. tomentosa* ao nível de subespécie de *K. coriacea*. Para justificar essa inclusão, Saddi (1982, p. 169) menciona que, além do indumento, não teria encontrado nenhum outro caráter estável para justificar a independência (quer dizer, o *status* de espécie) de *K. tomentosa*.

Por outro lado, o próprio autor menciona que *K. tomentosa* “is usually evergreen and showing branches usually thin and not suberized”. Além disso, Cambessèdes (1828), na descrição original de *K. tomentosa*, descreveu que no estilete há tricomas, que são claramente ilustrados. A presença de tricomas no estilete é um caráter muito incomum em todo o subgênero *Dendrodoxa* e Saddi simplesmente não menciona esse caráter.

Coleções de herbário vistas por Saddi e observações de especialistas (Bittrich, 2003; Oliveira & Sazima, 1990) indicaram problemas na classificação proposta para o complexo *K. coriacea*, incluindo identificações duvidosas do próprio Saddi.

Visando permitir um melhor entendimento a respeito das alterações da circunscrição das espécies presentes no complexo *K. coriacea* são apresentadas traduções de descrições originais e dos principais trabalhos para o grupo em Anexo 1. Abaixo encontra-se a atual circunscrição, apresentada por Saddi (1982).

#### Descrições apresentadas por Saddi

Seção *Coriaceae* Wawra emend. Saddi

Sin.: Sect. *Coriaceae* Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):301 (1886); Engler in Engler & Prantl, Natürl. Pflanzenfam. Ed. 1. 3(6):206 (1895).

Sect. *Corymbosae* Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):297 \*1886); Engler in Engler & Prantl, Natürl. Pflanzenfam. Ed. 1. 3(6):206 (1895).

Árvores ou arbustos, às vezes subarbustos eretos ou raramente prostrados. Folhas sésseis a distintamente pecioladas. Sépalas iguais a desiguais, margem coriácea. Anteras linear-retangulares, alongadas, base lobada a sublobada, ápice recurvado a sub-

recurvado, loceladas e com conectivo não dorsalmente proeminente; glândula dorso-apical distinta ou raramente minuta, globoide ou raramente pontuada. Estigma clavado.

Espécie tipo: *K. coriacea*.

Distribuição: Brasil, Paraguai e Bolívia, com 12 espécies predominantemente de cerrado.

Série *Coriaceae* (Wawra) Saddi

Sin.: Sect. *Coriaceae* Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):301 (1886); Engler in Engler & Prantl, Natürl. Pflanzenfam. 3(6):206 (1895).

Arbustos ou árvores, suberosos e sem xilopódio. Folhas geralmente escorbiculadas acima, coriáceas; nervura central expandida e com (2)3 mm de largura na base. Anteras alongadas, ao menos três vezes mais longas que largas.

Espécie tipo: *K. coriacea*.

Distribuição: Brasil e Paraguai.

*K. coriacea* Mart. & Zucc. Flora (Regensb.) 1(2):30 (1825); Mart., Nov. Gen. Sp. Pl. 1:112. Tab. 70 (1826); Cambess. in St.-Hil. Fl. Bras. Mer. 1:305 (1828); Pohl, Pl. Bras. 2:50 (1830); Don, Gen. Hist. 1:571 (1831); Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):301 (1886).

Sin.: *Martinieria arborea* Vell. Fl. Flum. 233 (1825); Vell. op cit. 5: tab. 114 (1831); Vell. in Netto-Lad., Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro 5:219 (1881). Velloso s.n. (n.v.).

*Bonnetia coriacea* Sprengel, Syst. Veg. 4(2):207 (1827).

*K. falcata* Cambess. in St.-Hil. Fl. Bras. Mer. 1:305 (1828); Don, Gen. Hist. 1:571 (1831); Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):301 (1886). Saint-Hilaire 1001.b.

[*K. carnea* Cambess. in Cambess., Mém. Hist. Nat. (Paris) 16:413 (1828a), n. nud.]

*K. tomentosa* Cambess. in St. Hil. Fl. Bras. Mer. 1:308. Tab. 61 (1828); Don, Gen. Hist. 1:571 (1831); Spach, Hist. Veg. 4:73 (1835); Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):303 (1886). Saint-Hilaire s.n., Bosa.

*K. oblonga* Pohl, Pl. Bras. 2:47. Tab. 130 (1830). Pohl 1006.

*K. microphylla* Pohl, Pl. Bras. 2:49. Tab. 132 (1830); Géel, Sert. Bot. 3:13 (1832); Reichenbach, Fl. Exot. 5:43 (1835); Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):302 (1886). Pohl 1025.

*K. coriacea* Mart. var. *α oblonga* (Pohl) Wawra in Mart., Fl. Bras. 12(1):302 (1886).

*K. coriacea* Mart. var. *brevisepala* Chodat & Hassler, Bull. Herb. Boiss. 3(12):1125 (1903). Hassler 5404; 8088.

[*K. coriacea* Mart. var. *nervosa* Glaz., Bull. Soc. Bot. Fr. 52(3):43 (1905), nom. nud. Glaziou 20701]

[*K. racemosa* Mart. Martius s.n., in schaed]

Arbustos ou árvores, não frequentemente subarbustos; caule (1-)2-8(-10) m, 5-25 cm de diâmetro, com a casca fortemente suberizada, descamando em placas grossas, irregulares e rachadas. Ramos (5-)10-15(-20) mm de diâmetro, glabros, com fissuras ou “rugas” longitudinais, com cicatrizes, cinza claro a escuro; casca muito suberizada, inteira ou descamante em escamas membráceas ou em tiras estreitas e curtas. Ramificações (branchlets) (3-)5-7(-10) mm de diâmetro, glabras ou com tricomas esparsos no ápice, finamente sulcadas ou enrugadas longitudinalmente, marrom-claras a amareladas; casca não suberizada, inteira ou descamante em películas finas e pequenas. Folhas (5-)6-20(-35) x (2-)3-10(-15) cm, elípticas a elíptico-obovadas ou oblongas e oblongo-obovadas a estreitamente oblongo-lanceoladas, glabras ou com indumento, subcoriáceas a rigidamente coriáceas, raro membráceas, superfície lisa a rugosa, marrom-claras a escuras ou esverdeadas em ambas as faces (quase concolores, mas mais claras na face abaxial), base cuneada a atenuada, ápice circular a obtuso, retuso a, às vezes, subapiculado; nervura central (2-)3-5(-10) mm de largura na base, glabra ou indumentada, proeminente; as outras nervuras podem ser indistintas, pouco ou muito visíveis, finas ou espessas e de não proeminentes a claramente salientes em ambas as superfícies, nervuras secundárias (3-)4-8(-12) mm distantes entre si, as terciárias e quaternárias são sub-reticuladas a densamente reticuladas; pecíolo ausente ou base foliar curtamente decorrente e com até 3(4) mm de comprimento (raramente o pecíolo pode alcançar 25 mm de comprimento). Inflorescência: racemo paucifloro e circundado por folhas apicais ou, às vezes, cimeiras 3-floras, corimbosas e basicamente agregadas em uma panícula; pedúnculo (4-)5-13(-22) cm, glabro a tomentoso, indistinto das ramificações na região de transição; pedicelos 1-3 cm de comprimento, tomentosos, às vezes tomentosos ou glabros; brácteas inferiores 20-70 x 5-15(-25) mm; brácteas superiores 8-25(-30) x 2-4(-6) mm oblongo-, ovado- ou raramente linear-lanceoladas, glabras ou indumentadas; bractéolas 5-7 x 2-3 mm, ovado-oblongas a ovado-lanceoladas, tomentosas. Flores brancas ou rosas. Sépalas (3-)4-7(-13) x (2-)3-6(-7) mm, ovadas a ovado-oblongas ou ovado-lanceoladas, tomentosas ou glabras, ciliadas, base obtusa e ápice obtuso ou subagudo. Pétalas (20-)25-30(-35) x 10-15(-20) mm, tomentosas, ciliadas, eretas ou reflexas. Anteras 1,5-3,5 x 0,5-1,75 mm, glândulas

distintas, globuloidais. Lobos do estigma 1-canaliculados. Cápsula 4-8(-13) cm de comprimento (imatura); sementes 40-60 x 10-15 mm, embrião com cerca de 20 x 15 mm.

Tipo: *Iter brasiliense*, Martius s.n. (lectótipo: M).

Nomes populares: banana-de-macaco, bastão-de-deus, bastão-de-menino-deus, bate-caixa, boi-manso, breu, corticeira, gordinha, malva-do-campo, pau-de-sangue, pau-santo, pau-santo-branco, pau-de-são-josé, pau-terra-do-cerrado e saco-de-boi. O mais comum é pau-santo.

Fenologia: ao longo do ano, exceto julho; geralmente início em agosto com pico entre novembro e dezembro.

Distribuição: Brasil (MG, SP, GO, DF, MT, MS, BA, PR, PA, AM) e Paraguai (Amambay e Alto Paraná).

*K. coriacea* Mart. & Zucc. subsp. *coriacea* Saddi

Ramificações glabras, às vezes hirtelas no ápice. Superfície foliar lisa, às vezes levemente rugosa na face superior; nervuras imperceptíveis a levemente proeminentes na face abaxial. Sépalas geralmente com até 13 x 7 mm.

*K. coriacea* Mart. & Zucc. (*coriacea*) var. *coriacea* Saddi

Folhas (-9)10-20(-27-35) x (3-)4-12(-15) cm, com forma muito variável, incluindo de oblonga a elíptica ou elíptico-obovada; nervura central (2-)3-6(-8) mm de largura na base; nervuras secundárias (3)4-8(-10) mm distantes entre si. Inflorescência: racemo simples ou às vezes 2-floro; pedúnculo (5-)7-10(-13) cm de comprimento; pedicelos com tricomas. Sépalas e pétalas tomentosas, com as sépalas (3-)4-7(-12) x 3-6(-7) mm e com forma muito variada. Nota: folhas oblongas são frequente e exclusivamente encontradas em espécimes do Paraná.

Floração: a mesma da espécie.

Distribuição: a mesma da espécie.

*K. coriacea* Mart. (*coriacea*) var. *guianensis* Saddi

Folhas 12-21(-25) x (4-)5-8(-9) cm, elíptica a obovada-elíptica; nervura central 4-6 mm de largura na base; nervuras secundárias (4-)5-8(-10) mm distantes entre si. Inflorescência cimeira 3-flora agregada e panícula; pedúnculo 15-22 cm de comprimento; pedicelos tomentosos. Sépalas e pétalas tomentosas, com as sépalas 4-6 x 3-5 mm.

Floração: novembro-dezembro.

Distribuição: MG, MT, MS.

*K. coriacea* Mart. (*coriacea*) var. *glabripes* Saddi

Folhas (10-)12-20(-23) x 4,5-7,5 cm, elípticas a obovado-elípticas; nervura central 4-7 mm de largura na base; nervuras secundárias (4-)5-8(-10) mm distantes entre si. Inflorescência: racemo simples ou subsimples; pedúnculo 7-9 cm de comprimento; pedicelos glabros. Sépalas 4-8 (-10) x 3-6 (-7) mm, glabras ou com tricomas esparsos no ápice. Pétalas tomentosas.

Floração: setembro-dezembro.

Distribuição: MG, MT, GO, DF, SP.

*K. coriacea* Mart. (*coriacea*) var. *microphylla* (Pohl) Saddi

Sin.: *K. microphylla* (Pohl)

Folhas (5-)6-8(-9) x 1,5-2 cm, estreitamente oblongas a oblongo-lanceoladas; nervura central com 1-2 mm de largura na base; nervuras secundárias 3-4(5) mm distantes entre si. Inflorescência: racemo simples ou subsimples; pedúnculo 3-7 cm de comprimento; pedicelos tomentosos. Sépalas e pétalas tomentosas, sépalas com 3-5 x 2-3 mm. Nota: variedade com as menores pétalas (2 cm).

Floração novembro-janeiro.

Distribuição: PR e GO.

*K. coriacea* Mart. subsp. *tomentosa* (Cambess.) Saddi

Sin.: *K. tomentosa* Cambess.

Ramificações com tricomas ou às vezes glabras. Superfície foliar rugosa, às vezes levemente rugosa ou lisa na face adaxial; nervuras fortemente proeminentes a não proeminentes na face inferior. Sépalas geralmente com até 7 x 5 mm. Notas: os táxons pertencentes a essa subespécie têm folhas elípticas a elíptico-obovadas ou oblongas; nervura central com (3-)4-6 mm de largura na base; nervuras secundárias (3-)4-10(-12) mm distantes entre si; inflorescência: racemo; pedúnculo 5-10(-12) cm de comprimento.

Distribuição: MG, GO, DF, MT, (BA).

*K. coriacea* Mart. (*tomentosa*) var. *tomentosa* (Cambess.) Saddi

Sin.: *K. tomentosa* Cambess.

Folhas (7-9-)10-20(-23) x (3-4-)5-9 cm, com tricomas esparsos ou, às vezes, glabras na face adaxial, densamente tomentosa e muito rugosa na face abaxial; nervuras visíveis e muito proeminentes na superfície inferior. Pedicelos e sépalas tomentosos.

Floração: setembro-dezembro (março)

Distribuição: MG, MT, DF.

*K. coriacea* Mart. (*tomentosa*) var. *intermedia* Saddi

Sin.: [*K. coriacea* Mart. var. *nervosa* Glaz., nom. nud]

Folhas (8-)10-20(-23) x (3-)4-10(12) cm, tomentulosas ou com tricomas esparsos em ambas as superfícies, às vezes glabra na face adaxial, levemente rugosa na abaxial; nervuras pouco visíveis e pouco ou não salientes na superfície inferior. Pedicelos e sépalas tomentulosos, podendo ter os pedicelos glabros.

Floração: setembro-novembro.

Distribuição: MG, GO, DF, (BA).

*K. coriacea* Mart. (*tomentosa*) var. *pseudotomentosa* Saddi

Folhas 15-24(-27) x (6)7-11(-14,5) cm, tomentulosas ou com tricomas esparsos em ambas as superfícies, às vezes glabra na face adaxial, muito rugosa na abaxial; nervuras visíveis e muito proeminentes na superfície inferior. Pedicelos e sépalas com tricomas, podendo ter os pedicelos glabros.

Floração: novembro-dezembro.

Distribuição: MT.

*K. grandiflora* (Wawra) Saddi

Sin.: *K. coriacea* Mart. var.  $\beta$  *grandiflora* Wawra in Mart. Fl. Bras. 12(1):302. Tab. 59. Fig. II (1886). Pohl 110.

[*K. grandiflora* St.-Hilaire. Pohl 110, in schaed.]

Arbustos ou árvores; caule 3-6 m, 10-20 cm de diâmetro, casca muito suberizada, irregular e profundamente rachada, descamando em placas espessas. Ramos (15-)20-30(-35) mm de diâmetro, glabros, com fissuras e rugas longitudinais, com cicatrizes, acinzentados ou cinza amarronzados; casca espessa, inteira ou descamando em tiras finas. Ramificações 5-10 mm de diâmetro, glabras, cilíndricas, sulcadas, marrom claras; casca geralmente não suberizada, inteira ou descamando em pequenas películas. Folhas

10-20(-27) x (4-)5-10(-15) cm, elípticas a elíptico- ou oblongo-obovadas, às vezes obovado-suborbicular, glabras, subcoriáceas ou coriáceas, superfície lisa ou levemente rugosa e marrom-amarelada a esverdeada em ambas as superfícies (geralmente concolores), base atenuada, ápice obtuso a arredondado e às vezes retuso; nervura central 7-10 mm de largura na base, glabra, saliente; as outras nervuras são paralelas, finas e variam de não a levemente proeminentes em ambas as superfícies, nervuras secundárias 1-2(3) mm distantes entre si, pouco visíveis a indistintas e nervuras terciárias e quaternárias imperceptíveis em ambas as faces; pecíolo ausente ou formado pela base foliar levemente decorrente, 2-8(-10) mm de comprimento. Inflorescência: cimeiras 3-floras agregadas em panícula, mais ou menos corimbosa, circundada por folhas apicais; pedúnculo (5-)7-10(-15) cm de comprimento, glabros, distinto na região de transição com as ramificações, amarronzado a marrom amarelado; pedicelos 10-15(-20) cm de comprimento (provavelmente o autor se enganou), glabros; brácteas inferiores 15-60 x (3)5-25 mm, com formas similares às das folhas vegetativas, às vezes obovado- a oblongo-lanceoladas; brácteas superiores (4)5-20 x 2-4(5) mm, oblongo- a ovado-lanceoladas, glabras. Flores brancas. Sépalas (6)7-10(-13) x (4)5-7(8) mm ovado-oblongas a ovado-elípticas, tomentosas ou glabras, ciliadas ou não, com base obtusa, ápice estreitamente obtuso a agudo ou subagudo. Pétalas 25-30 x 15-20 mm, tomentulosas ou glabras, ciliadas ou não, eretas ou reflexas. Anteras 1,5-3,5 x 0,5-0,75 mm, com glândulas distintas, globoides. Lobos do estigma 1-canaliculado. Cápsula com cerca de 16 cm de comprimento (imatura); sementes 40-70 x 15-20 mm, embrião 20 x 15 mm

Nome popular: gordinha

Floração: (junho-agosto) setembro (outubro).

Distribuição: MT, MG, RO, GO, (SP).

Ao analisar as descrições apresentadas em Anexo 1 e acima, é possível perceber que a circunscrição de *K. coriacea* é controversa há muito tempo. A última alteração na classificação da espécie, realizada por Saddi (1982), tornou a identificação de espécimes um trabalho quase impossível de ser realizado até mesmo por um especialista.

Considerando o a necessidade de identificação correta de *K. coriacea*, uma vez que esta é uma espécie frequente no cerrado e, assim, nas listas e levantamentos realizados neste bioma e as dúvidas geradas pelo trabalho de Caddah (2009) com relação às categorias infraespecíficas de *K. coriacea*, o presente estudo objetivou

complementar os trabalhos iniciados por Caddah, através da verificação da utilidade e da validade das categorias infraespecíficas criadas por Saddi. Para tal, além da taxonomia clássica, apresentada neste capítulo, foram utilizadas a anatomia e a genética (ver capítulos 2 e 3).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo baseou-se na leitura da maior quantidade possível de descrições das espécies relacionadas ao “complexo *Kielmeyera coriacea*” (incluiu a descrição original da espécie e obras que descreveram tanto *K. coriacea* quanto espécies que posteriormente foram sinonimizadas – apresentadas em Anexo 1), visita a herbários e análise de coleções disponíveis na internet e viagens de coleta.

### Trabalho de campo

Ao todo foram realizadas oito viagens de campo, buscando abranger grande parte da área de ocorrência da espécie e sua diversidade morfológica. Os trajetos foram elaborados com base em localidades mencionadas em exsicatas, na relação de ocorrência das espécies apresentada no trabalho de Saddi (1982) e em trajetos de pesquisadores antigos (por ex. “caminho real” para MG).

A seguir encontra-se uma lista com breve descrição das viagens de campo (listagem dos herbários visitados e localidades exatas das populações e do material botânico coletados serão fornecidos nas Tabelas 1 e 2 e algumas das localidades representadas na Figura 1):

1<sup>a</sup> – Distrito Federal (05/2009)

Marcação de três populações de *Kielmeyera coriacea* e uma de *Kielmeyera grandiflora* (não houve escolha anterior da localidade exata das populações; elas foram marcadas conforme foram encontrados grupos de no mínimo 30 indivíduos). Visita aos herbários do DF e de GO. Coleta de material botânico.

2<sup>a</sup> – Minas Gerais (10/2009)

Marcação de três populações de *K. grandiflora* e duas de *K. coriacea*. Visita ao herbário BHCB. O roteiro seguido no trajeto ao longo das cidades históricas foi até Diamantina e buscou refazer o caminho real (usando estradas de terra quando necessário). Coleta de material botânico.

3<sup>a</sup> – Mato Grosso (12/2009)

Marcação de duas populações de *K. coriacea* a duas de *K. grandiflora* (única situação em que foi possível marcar populações simpátricas das duas espécies). Visita ao herbário UFMT. É importante citar que um dos pontos de coleta foi exatamente o mesmo mencionado por Saddi para uma das variedades (1982). Coleta de material botânico.

4ª – Bahia (01/2010)

Marcação de quatro populações de *K. coriacea* ao longo do trajeto Barreiras-Salvador. Visita aos herbários localizados em Salvador e Feira de Santana. Coleta de material botânico.

5ª – Goiás (01/2010)

Marcação de cinco populações, sendo três de *K. coriacea* e duas de *K. grandiflora* ao longo do trajeto Catalão-Alto Paraíso de Goiás. Visita ao herbário HUFU. Coleta de material botânico.

6ª – Diamantina (10/2010)

Vista ao herbário DIA. Viagem para realização de observações de campo de possível *K. microphylla* Pohl encontrada com elevada frequência na região na coleta realizada anteriormente pelo estado de Minas Gerais. Coleta de material botânico.

7ª – São Paulo (10/2010)

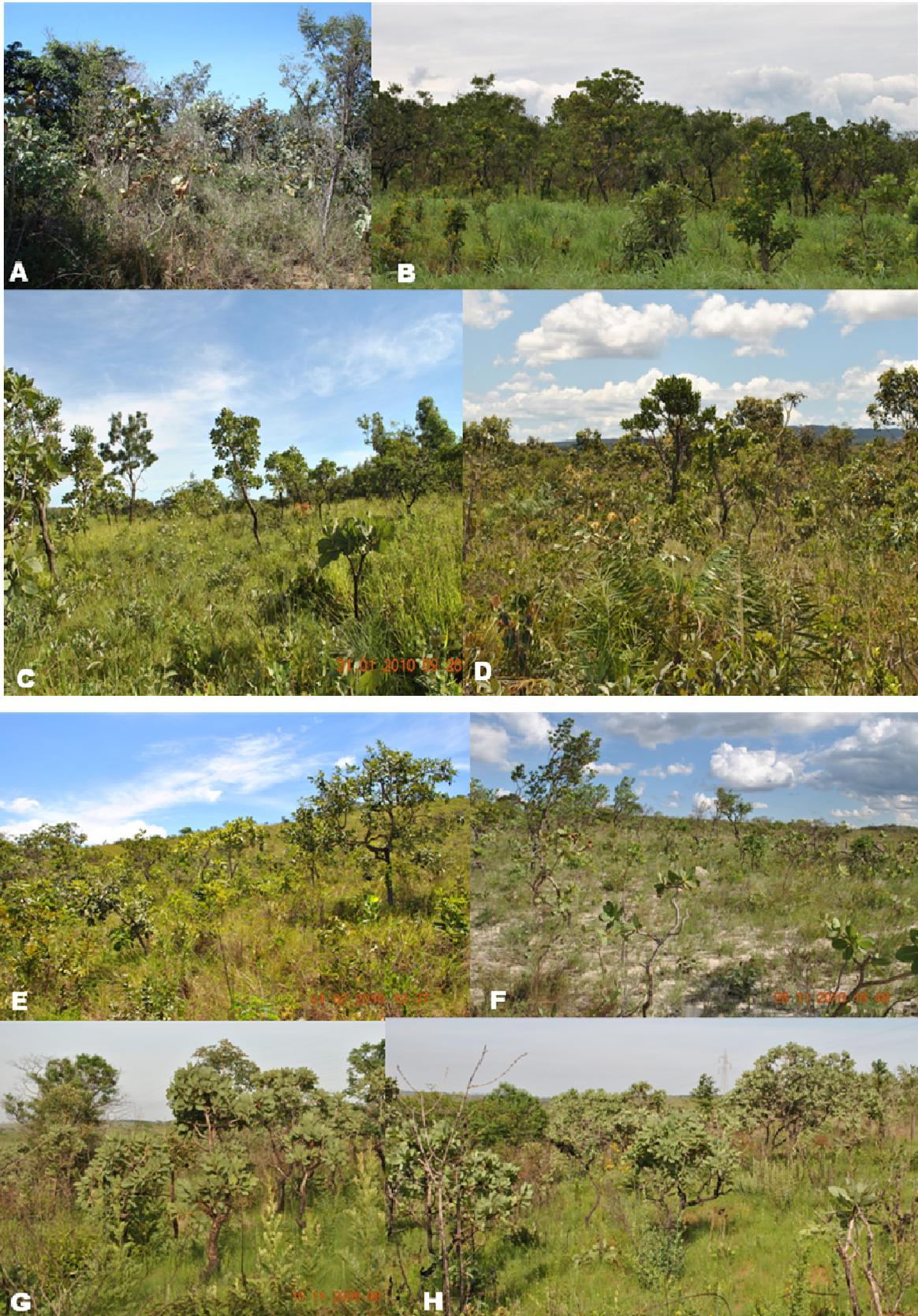
Marcação de uma população de *K. grandiflora* (a única coletada com flores desta espécie). Coleta de material botânico.

8ª- Tocantins (12/2010)

Marcação de quatro populações de *K. coriacea* . Estado de grande importância por apresentar plantas com morfologia um pouco diferente e possuir pouquíssimo material em coleções botânicas. Coleta de material botânico.

Tabela 1: Locais de coletas das populações e respectiva identificação conforme Saddi (1982).

População	Estado	Localidade	Identificação
1	DF	Entre Araguari e Catalão. BR-050 km 33 (S 18.40536; W 48.10440).	População possivelmente mista de <i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i> e <i>K. rubriflora</i>
2	DF	APA Cafuringa - Brasília (S 15.37152; W 47.52243).	<i>K. grandiflora</i>
3	DF	RECOR - IBGE - Brasília (S 15. 57400; W 47. 53170).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
4	DF	RECOR - IBGE - Brasília (S 15. 57400; W 47. 53170).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
5	MG	Terreno no bairro Pq. Bocaina - Lavras (S 21.15525; W 44.59580).	<i>K. grandiflora</i>
6	MG	Próximo a Fazenda Vargem Grande - Estrada Lavras- São João del Rei (S 21.17540; W 44.42475).	<i>K. grandiflora</i>
7	MG	Estrada São João del Rei - Lavras. BR-265 km 272 (S 21.13322; W 44.22102).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
8	MG	Biribiri - Diamantina (S 18.13150; W 43.36532).	<i>K. grandiflora</i>
9	MG	Posto Kobu (Rede Brasil) indo para Gouveia. BR- 259 (S 18.25590; W 43.43470).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
10	MT	Mata Fria - Chapada dos Guimarães - Córrego Congonhas (S 15.23031; W 55.50209).	<i>K. grandiflora</i>
11	MT	Entre Salgadeira e Manso. BR km 32 (S 15.20362; W 55.55177).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
12	MT	Entre Salgadeira e Manso. BR km 32 (S 15.20362; W 55.55177).	<i>K. grandiflora</i>
13	MT	Estrada da Guia, km 6-8 (S 15.30486; W 56.07263).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
14	BA	Serra do Mimo - Barreiras (S 12.09176; W 44.57212).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
15	BA	Estrada para o povoado Campos de São João. BR-242 (S 12.26392; W 41.29317).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
16	BA	Estrada do Palmeiral - São Desidério (S 12.29078; W 45.01187).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
17	BA	BR-242, Barreiras - Feira de Santana (S 12.29136; 41.20345).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
18	GO	BR-050 km 54 (S 16.28246; W 47.48377).	<i>K. grandiflora</i>
19	GO	Planaltina (15.35435; W 47.39249).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
20	GO	Em direção às cachoeiras do Macacão e Macaquinho - Alto Paraíso (S 14.14586; W 47.22145).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
21	GO	Em direção à cachoeira dos Cristais - Alto Paraíso (S 14.05556; W 47.30063).	População híbrida - <i>K. grandiflora</i> x <i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
22	GO	Entrada de Alto Paraíso pela estrada que vem de São Jorge (S 14.08407; W 47. 31261).	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>tomentosa</i>
23	TO	TO-110 km 75.	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
24	TO	TO-110 km 77.	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
25	TO	A 54 km da entrada de Taguatinga. Rodovia entre Ponte Alta do Bom Jesus e Dianópolis. A 10 km de Ponte Alta do Bom Jesus, entre Ponte Alta do Bom Jesus e Boa Vista de Belém.	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
26	TO	Belém.	<i>K. coriacea</i> subsp. <i>coriacea</i>
27	SP	Clube Recreativo Campestre - Jd. Guadalajara - Sorocaba.	<i>K. grandiflora</i>



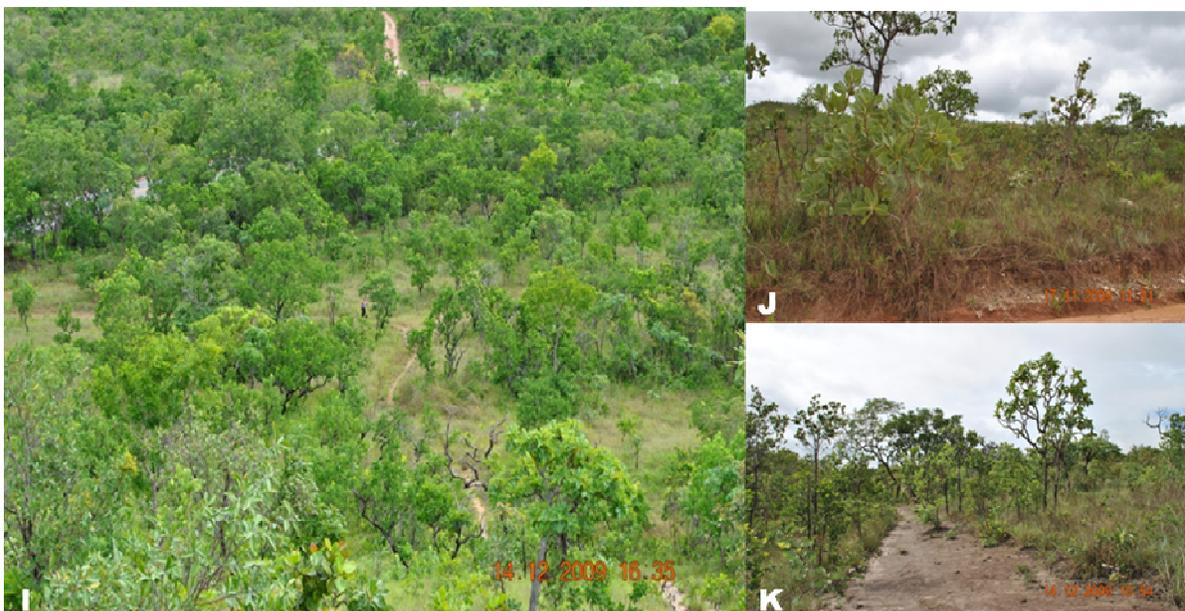


Figura 1: Locais de coleta de indivíduos/populações. Distrito Federal: A, Tocantins: B e J, Goiás: C, D e E, Minas Gerais: F, G e Mato Grosso: H., I e K.

### Visitas a herbários e análise de material

As exsicatas foram analisadas a “olho nu” e com o auxílio de microscópio estereoscópico visando encontrar caracteres que permitam a compreensão do complexo. A lista de caracteres encontrados será mencionada nos resultados. As coleções dos herbários visitados foram fotografadas e identificadas; a identificação foi realizada conforme a circunscrição de Saddi (1982) devido a não resolução do complexo até poucos meses antes do fim deste trabalho.

O material botânico coletado foi prensado em campo e mantido em jornal e prensa até o retorno da viagem. Os espécimes prensados foram mantidos em freezer por um dia para evitar a perda de folhas e, posteriormente, acondicionados em estufas elétricas (Departamento de Biologia Vegetal, IB, Unicamp) a 60°C até a secagem completa (alguns materiais precisaram de mais de três dias). Durante a realização do trabalho, este material foi armazenado na Ala Oeste do Herbário UEC, onde permaneceram até a montagem das exsicatas e incorporação à coleção do Herbário UEC. Infelizmente grande parte do material herborizado perdeu as folhas, pois as coletas tiveram duração média de cinco dias e neste período não foi possível ter acesso a um freezer.

Neste material foi incluído o material testemunho de indivíduos utilizados no estudo de anatomia estrutural e no de genética de populações, assim como

representantes da diversidade morfológica da espécie coletados nos trajetos percorridos entre a coleta de uma população e outra.

Foram elaboradas descrições dos padrões da morfologia foliar observada para táxon. Serão apresentadas na discussão possíveis alterações nas categorias (exclusão de algumas variedades, reconhecimento de espécies).

Tabela 2: Coleções de herbários analisadas e fotografadas (em azul as virtuais).

<b>Sigla</b>	<b>Instituição</b>	<b>Localidade</b>
CEN	EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN	Brasil. Distrito Federal. BRASÍLIA.
HEPH	Jardim Botânico de Brasília	Brasil. Distrito Federal. BRASÍLIA.
IBGE	RECOR - Reserva Ecológica do IBGE	Brasil. Distrito Federal. BRASÍLIA.
UB	Universidade de Brasília	Brasil. Distrito Federal. BRASÍLIA.
UFG	Universidade Federal de Goiás	Brasil. Goiás. GOIÂNIA.
BHCH	Universidade Federal de Minas Gerais	Brasil. Minas Gerais. BELO HORIZONTE.
HUFU	Universidade Federal de Uberlândia	Brasil. Minas Gerais. UBERLÂNDIA.
HDJF	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri	Brasil. Minas Gerais. DIAMANTINA
ALCB	Universidade Federal da Bahia, Campus Universitário de Ondina	Brasil. Bahia. SALVADOR.
HRB	IBGE	Brasil. Bahia. SALVADOR.
HUFS	Universidade Estadual de Feira de Santana	Brasil. Bahia. FEIRA DE SANTANA.
UFMT	Universidade Federal de Mato Grosso	Brasil. Mato Grosso. CUIABÁ.
HB	Herbarium Bradeanum	Brasil. Rio de Janeiro. RIO DE JANEIRO.
RB	Jardim Botânico do Rio de Janeiro	Brasil. Rio de Janeiro. RIO DE JANEIRO.
UEC	Universidade Estadual de Campinas	Brasil. São Paulo. CAMPINAS.
B	Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Zentraleinrichtung der Freien Universität Berlin	Alemanha. BERLIM.
NY	New York Botanical Garden	U.S.A. Nova York. BRONX.
K	Royal Botanic Gardens	U.K. England. KEW.
M	Botanische Staatssammlung München	Alemanha. MUNIQUE.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1 – Considerações morfológicas

#### 1.1 – Inflorescência

As inflorescências em grande parte dos indivíduos observados de *K. coriacea* assemelham-se a um dicásio ou a alguma redução desta forma, porém podem ser encontrados racemos. Há diferenças quanto ao grau de proximidade dos botões florais, sendo na maioria das vezes as inflorescências densas em *K. coriacea* e laxas e *K. grandiflora*. Nesta, as inflorescências geralmente são racemos.

#### 1.2 – Flor (Figura 2)

Não foi possível observar profundamente a estrutura floral, porém poucas diferenças foram notadas com relação ao tamanho e morfologia. Um breve relato será apresentado.

As flores podem ser hermafroditas ou masculinas; flores masculinas foram encontradas com frequência maior que a esperada, pois são pouco relatadas em literatura. Quando hermafroditas, geralmente apresentam:

- Sépalas: verdes e menores que as pétalas.
- Pétalas: brancas (na grande maioria dos casos pra *K. coriacea*) ou rosa (situação mais frequente em *K. grandiflora*), podendo haver mistura das duas cores na mesma população e no mesmo indivíduo; apresentam-se abertas ou reflexas, têm laterais desiguais (o quanto as laterais das pétalas diferem pode variar); tricomas foram observados.
- Androceu: estames numerosos, com filetes amarelo-esverdeados e anteras amarelas; apresentam tamanhos de filete variados o que permite a organização em uma estrutura semelhante à hemisfera; as glândulas nas anteras, se ocorrerem nas espécies estudadas, são de difícil observação (geralmente mais fácil em botão, na antese produzem óleo e, assim, murcham).
- Gineceu: ovário com forma ovoide, três lados e três sulcos, lembrando a forma do fruto; o estilete pode apresentar tricomas, mas essa situação é pouco frequente e será mencionada posteriormente; estigma expandido, verde, liso, trilobado, úmido.

De maneira geral os botões florais de *K. grandiflora* são aparentemente maiores que os de *K. coriacea*; para a subespécie *coriacea* foram observados alguns indivíduos com botões de tamanho muito reduzido; talvez seja interessante a realização de estudos morfométricos envolvendo flores, botões florais e inflorescências.



Figura 2: Flores de *K. coriacea* masculina (esquerda) e hermafrodita (direita).

### 1.3 – Caule

A forma do caule e de suas ramificações podem auxiliar na identificação das espécies quando se trata de *K. coriacea* e *K. grandiflora*. Ambas possuem caule bastante suberizado, descamante em placas, porém em *K. grandiflora* o diâmetro do caule geralmente é maior e os indivíduos menores, conferindo o aspecto de uma planta “atarracada”, truncada.

Os ramos podem apresentar diferentes formas conforme o tempo de crescimento dessa parte da planta: se ela apresentou um crescimento muito rápido, eles geralmente são mais finos, menos suberizados e nem sempre é possível notar diferenças entre um ramo reprodutivo e um vegetativo; caso o crescimento tenha sido lento, os ramos vegetativos apresentam-se menos suberizados que o caule, mas mais que os ramos

reprodutivos, sendo evidente na maioria dos casos a região de transição entre ramos vegetativos e ramos reprodutivos. Com relação à transição de ramos, *K. grandiflora* apresenta um claro afinamento do ramo, quando este se torna reprodutivo e, em geral, não há muitas ramificações deste, enquanto *K. coriacea* apresenta uma transição mais sutil e nem sempre tão evidente e o ramo reprodutivo muitas vezes não se mostra a continuação de um vegetativo, mas uma ramificação lateral deste. Ambas as espécies apresentam cicatrizes foliares extremamente evidentes.

Quanto a hábito e tamanho, *K. grandiflora* em geral é uma arvoreta, podendo ser arbustiva ou atingir o porte arbóreo. Grande parte dos indivíduos observados em campo apresentou altura entre 1 e 2 m, havendo casos em que ultrapassaram 4 m de altura. Em *K. coriacea*, o hábito apresenta variações, sendo arbusto, arvoreta e árvore os mais frequentes; nesta espécie foi mais comum a ocorrência de indivíduos com porte arbóreo, atingido cerca de 5 m de altura.

Essas características auxiliam na identificação das espécies, porém isoladamente nem sempre são capazes de garantir que a identificação seja correta uma vez que há sobreposição e que os híbridos podem ser mais parecidos com um parental ou outro.

#### 1.4 – Folhas

Neste trabalho, as folhas apresentaram as características mais importantes para a distinção das espécies. A seguir seguem considerações a respeito dos três principais padrões encontrados denominados padrão 1 (*K. grandiflora*), padrão 2 (*K. coriacea* subsp. *coriacea*) e padrão 3 (correspondente a *K. coriacea* subsp. *tomentosa sensu* Saddi, mas possivelmente *K. tomentosa sensu* Cambessèdes).

A ocorrência de formas intermediárias provavelmente resulta da grande plasticidade das espécies, dada a ampla área de ocorrência, associada à formação de híbridos (relatada por Caddah 2009).

- *K. grandiflora* – Padrão 1 (Figura 3): folhas frequentemente com forma obovada, podendo ser elípticas, ápice obtuso a arredondado ou retuso, base geralmente decorrente, podendo ser aguda, margem inteira; são subcoriáceas, em geral levemente suculentas, glabras, apresentam coloração verde igual em ambas as faces foliares (em material herborizado podem também apresentar coloração amarelada ou amarronzada), muitas vezes são glaucas. As superfícies são lisas ou levemente rugosas. A nervura principal é levemente saliente a saliente na face abaxial, apresenta coloração amarela

esverdeada e alarga-se do ápice para a base; neste padrão, as nervuras secundárias possuem muita regularidade em sua distribuição, são frequentemente paralelas e podem ser imperceptíveis ou levemente proeminentes. As nervuras intersecundárias geralmente acompanham as secundárias, formando uma folha com numerosas nervuras finas, paralelas entre si, extremamente próximas e regularmente distribuídas. É comum que as nervuras secundárias e terciárias se tornem imperceptíveis (não visíveis, nem salientes) em material herborizado. O pecíolo é ausente ou curto e com base foliar decorrente.

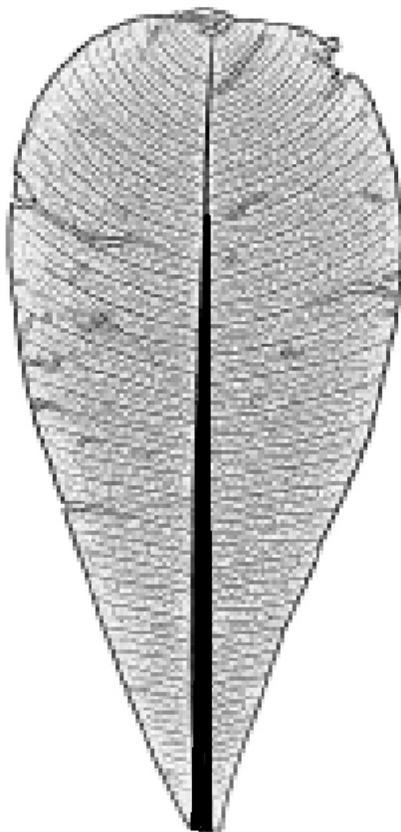


Figura 3: Esquema foliar representando a venação foliar típica de *K. grandiflora*, padrão 1 (modificada de Manual of leaf architecture, Wing *et al.* 1999).

Material examinado: GO: **Caldas Novas**, *P. Gibbs et al.* 2852, 09/IX/1976 (UEC 15160); **Chapadão do Céu e Mineiros**, *M.A. Batalha* 2004, 01/II/1998 (UEC 159669); MG: **Capitólio**, *L.S. Kinoshita et al.* 08-255, 05/XI/2008 (UEC 148961); **Diamantina**, *R.J. Trad* 32 & *M.F.D.J. Trad*, 17/XI/2009 (UEC 159079); **Diamantina**, *R.J. Trad* 33 & *M.F.D.J. Trad*, 17/XI/2009 (UEC 159081); **estrada BH-Serra do Cipó**, *R.J. Trad* 23 & *M.F.D.J. Trad*, 16/XI/2009 (UEC 159070); **estrada São João del Rei-Lavras**, *R.J. Trad* 17 & *M.F.D.J. Trad*, 15/XI/2009 (UEC 159107); **estrada São João del Rei-Lavras**, *R.J. Trad* 11 & *M.F.D.J. Trad* (UEC 159106), 14/XI/2009; **Serra do Cipó**, *R.J. Trad* 30 & *M.F.D.J. Trad*, 16/XI/2009 (UEC 159077); **Ituyutaba**, *A. Macedo* 523, 18/IX/1944 (JBRB 54211);

MT: **Chapada dos Guimarães**, R.J. Trad 49 & N. Urquiza, 14/XII/2009 (UEC 159115); **Chapada dos Guimarães**, O.S. Nasser 488, 04/X/2005 (UFMT 38028); **entre Salgadeira e Manso**, R.J. Trad 56 & N. Urquiza, 14/XII/2009 (UEC 159121); **estrada Cuiabá-Salgadeira, km 35**, N. Saddi 1366, 11/X/1975 (JBRB 176574); **Poconé**, A.L. Prado 139 & G. Guarim Neto, 15/IX/1988 (UFMT 11934); **a 60 km de Utiariti**, R. Becker 006, 06/03/1978 (UFMT 3846); **São Vicente, BR-364 desvio para Brasília**, N. Saddi 1385, 19/III/1978 (JBRB 219992); SP: **Campinas**, M.K. Caddah 273, 12/XI/2008 (UEC 148198); **Mogi-Guaçu**, W. Mantovani 985, 14/XI/1980 (UEC 255964); **Sorocaba**, R.J. Trad et al. 99, 26/X/2010 (UEC 158933).

- *K. coriacea* subsp. *coriacea* – Padrão 2 (Figura 4): folhas, frequentemente com forma elíptica, podendo ser levemente obovadas ou oblongo-oblancoeladas, ápice obtuso a arredondado ou retuso, base geralmente decorrente, podendo ser aguda, margem inteira; são cartáceas, subcoriáceas ou menos frequentemente coriáceas, quando jovens ou de rebrota podem ser membranáceas; glabras ou pilosas, apresentam coloração verde, podendo ser concolores ou levemente discolores (em material herborizado podem também apresentar coloração amarelada ou amarronzada), muito raramente são glaucas (possivelmente indivíduos com esta característica são híbridos de *K. coriacea* e *K. grandiflora*). As superfícies incluem formas lisas a levemente rugosas ou raramente rugosas. A nervura principal é levemente saliente a saliente na face adaxial e geralmente saliente na abaxial, apresenta coloração amarela esverdeada e alarga-se do ápice para a base, porém é mais estreita que a encontrada no padrão 1; neste padrão, as nervuras secundárias podem apresentar regularidade ou ter pequenas variações em seus ângulos entre uma e outra, conferindo um aspecto menos “uniforme” que o padrão 1; são frequentemente paralelas e podem ser imperceptíveis a proeminentes na face abaxial e/ou na adaxial. As nervuras terciárias e quaternárias são de difícil observação em material herborizado, variando de imperceptíveis a visíveis e imersas no limbo ou levemente salientes. O pecíolo é ausente, curto e com base foliar decorrente ou claramente diferenciado e cilíndrico.



Figura 4: Imagem ilustrando o padrão foliar de *K. coriacea* subsp. *coriacea* (padrão 2).

Material examinado: BA: **Coribe**, *S. Bridgewater 1013*, 23/VII/1998 (UB s.n.), **Formosa do Rio Preto**, *B.M.T. Walter et al. 2888*, 11/XI/1995 (UEC 106137), **São Desidério**, *R.J. Trad 69 & M.F.D.J. Trad*, 16/II/2010 (UEC 159023); DF: **a 5 km de Planaltina**, *R.J. Trad et al. 131*, 17/XII/2010 (UEC 158927), **ca. 20 km SE de Brasília**, *M.A. Alves 40*, 16/III/1983 (UEC 44513); GO: **Alto Paraíso**, *R.J. Trad 94 & M.B.S. Cortez*, 01/II/2010 (UEC 159040), **Alvorada do Norte**, *G. Gottsberger 16-9267*, 09/II/1967 (UEC 112856), **Barro Alto**, *B.M.T. Walter et al. 3124*, 08/II/1996 (UEC 94384), **Chapadão do Céu e Mineiros**, *M.A. Batalha 2119*, 01/XI/1998 (UEC 159670), **Pirenópolis**, *J. Semir et al. 20578*, 08/XII/1987 (UEC 49622), **a 12 km SO de Caldas Novas**, *E.P. Heringer 14153*, 21/XII/1974, **entre Luziânia e Cristalina, BR-040, km 80-81**, *R.J. Trad et al. 133*, 17/XII/2010 (UEC 158929), **estrada Monte Alegre para Campos Belos**, *R.J. Trad et al. 112*, 14/XII/2010 (UEC 159052), **GO-118, km 202**, *R.J. Trad et al. 111*, 14/XII/2010 (UEC 159057), **estrada Goiânia-Anápolis, km 42**, *G.J. Shepherd et al. 3605*, 26/XI/1976 (UEC 15163); MG: **Belo Horizonte**, *R.P. Martins 9245*, 11/II/1979 (UEC 15169), **Capitólio**, *L.S. Kinoshita et al. 08-252*, 05/XI/2008 (UEC 148989), **Delfinópolis**, *S.M. Silva et al. 424*, 07/XII/2002 (UEC 158959), **estrada São João Del Rei-Lavras**, *R.J. Trad 14 & M.F.D.J.*

*Trad*, 14/XI/2009 (UEC 159103), **Jaboticatubas**, *R.P. Martins* 9246, 26/XII/1978 (UEC 15168), **Lavras**, *R.P. Martins* 9251, 21/XII/1978 (UEC 15165), **Lavras**, *R.P. Martins* 9252, 21/XII/1978 (UEC 15164), **São Roque de Minas**, *M.K. Caddah et al.* 227, 20/XII/2007 (UEC 147862), **São Sebastião das águas Claras**, *R.P. Martins* 64, 03/XII/1980 (UEC 34507), **Serra das Araras**, *R.C. Martins* 387 & *B.M. Gomes*, 11/XI/2003 (UB 16219), **Trilha Paraíso Perdido, ca. 5 km da MG-050**, *J.N. Nakajima et al.* 4078, 30/VI/2006 (UEC 158958), **Uberlândia**, *I. Schiavini* 3 & *V.C. Apolinário*, 11/II/1995 (UEC 158962), **a 5 km O de Corinto**, *H.S. Irwin et al.* s/n 04/03/1970 (UEC 113186), **a 20 km S de Diamantina**, *I. Gottsberger* 66-251085, 25/X/1985 (UEC 112860), **a 10 km NE de Paracatu**, *H.S. Irwin et al.* 25860, 03/III/1970 (UEC 113178), **a 30 km NE de Patrocínio**, *H.S. Irwin et al.* 25653, 29/II/1970 (UEC 113159), **BR-050, km 139-141**, *R.J. Trad et al.* 104, 13/XII/2010 (UEC 159049), **MG-10, km 73-74**, *R.J. Trad* 27 & *M.F.D.J. Trad*, 16/XI/2009 (UEC 159073); MS: **Amambaí**, *G. Hatschbach* 47298 & *R. Callejas*, 16/XII/1983 (UEC 120801), **Corumbá**, *G.A. Damasceno Junior et al.* 2988, 21/XI/2001 (UEC 145208), **Selvira**, *J. dos Santos* S229, 04/II/1991 (UEC 59360), **Três Lagoas**, *R.J. Trad* 63 & *N. Urquiza*, 17/XII/2009 (UEC 158918); MT: **Chapada dos Guimarães**, *R.J. Trad* 47 & *N. Urquiza*, 14/XII/2009 (UEC 159114), **Nobres**, *V.C. Souza et al.* 17112, 24/IV/1997 (UEC 94110), **entre Salgadeira e Manso**, *R.J. Trad* 52 & *N. Urquiza*, 14/XII/2009 (UEC 159118), **estrada da Guia km6-8**, *R.J. Trad* 60 & *N. Urquiza*, 16/XII/2009 (UEC158815); PR: **Jaguariaíva**, *A. Uhlmann* 48 & *D.J.S. Carrião* 3, 10/II/1995 (UEC 75708); RO: **a 40 km de Vilhena**, *B.W. Nelson* 383, 07/XI/1979 (UEC 104626); SP: **Águas de Santa Bárbara**, *J.A.A. Meira Neto* 465, 07/XII/1989 (UEC 58774), **Alumínio**, *M.K. Caddah et al.* 294, 21/XI/2008 (UEC 148386), **Alumínio**, *M.K. Caddah et al.* 286, 21/XI/2008 (UEC 148401), **Botucatu**, *G. Gottsberger* 32-17179 & *I. Gottsberger*, 17/II/1979 (UEC 112858), **Botucatu**, *R.P. Martins* 9360 & *L.M. Paleari*, 14/02/1979 (UEC 15170), **Campinas**, *C.N. Begnami* 22233, 08/XI/1989 (UEC 58305), **Guareí**, *Neves & Cerantola*, *IPH-USP-056*. 09/II/1981 (UEC 23364), **Itapeva**, *J.M. Torezan et al.* 739, 17/XII/1997 (UEC 98238), **Itirapina**, *Leitão Filho et al.* 15921, 26/II/1984 (UEC 36454), **Itirapina**, *S.N. Pagano* 580, 13/XI/1984 (UEC 99393), **Itu**, *W.S. Souza* 25400 & *S.M. Silva*, 08/II/1987 (UEC 68690), **a 25 km NO de Mogi-Guaçu**, *P.E. Gibbs* 4166, 16/XII/1977 (UEC 15173); TO: **Almas**, *J.M. Felfili et al.* 578, 21/IV/2004 (UEC 157392), **a 2 km de Ponte Alta do Bom Jesus** *R.J. Trad et al.* 123, 15/XII/2010 (UEC 159067), **a 10 Km de Ponte Alta do Bom Jesus**, *R.J. Trad et al.* 129, 16/XII/2010 (UEC 158925), **TO-110, km 75**, *R.J. Trad et al.* 115, 15/XII/2010 (UEC 159059).

Comparando os padrões 1 e 2, é facilmente observável que as nervuras secundárias e terciárias encontram-se mais distantes entre si no segundo.

- *K. coriacea* subsp. *tomentosa* - Padrão 3 (Figura 5): folhas, geralmente elíptica ou obovada, ápice obtuso a arredondado ou retuso, base geralmente decorrente, podendo ser aguda, margem inteira e revoluta; são frequentemente coriáceas, raro subcoriáceas, pilosas na face abaxial e menos frequentemente com tricomas esparsos na face adaxial;

a distribuição dos tricomas na face abaxial pode variar entre um dos tipos: tricomas somente na nervura central ou tricomas distribuídos sobre todas as nervuras. Apresentam coloração verde, são frequentemente discolores, raro concolores ou levemente discolores (em material herborizado podem também apresentar coloração amarelada ou amarronzada), não são glaucas. As superfícies geralmente são rugosas, podendo raramente ser levemente rugosas ou lisas. A nervura principal não é saliente na face adaxial e mostra-se proeminente na abaxial, apresenta coloração amarela esverdeada e alarga-se do ápice para a base, porém é mais estreita que a encontrada no padrão 1; neste padrão, as nervuras secundárias apresentam o maior grau de irregularidade, raramente estas se encontram organizadas como nos outros 2 padrões. São frequentemente muito proeminentes na face abaxial e imperceptíveis a levemente imersas na face adaxial e apresentam a maior distância entre si encontrada para as espécies da série. As nervuras terciárias e quaternárias também são proeminentes ou levemente proeminentes na face abaxial. O pecíolo é ausente, formado pela base foliar levemente decorrente ou claramente diferenciado e cilíndrico.



Figura 5: padrão de nervuras de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (possível *K. tomentosa* Cambess.)

Material examinado: BA: **Caetité**, *M.L. Guedes et al. 5423*, 11/III/1997 (HUEFS 62248), **Caetité**, *M.L. Guedes et al. 14310*, 19/XII/2007 (ALCB 82284), **Chapada Diamantina**, *B. Stannard 4985*, 03/III/1997 (ALCB 35979), **Correntin**, *B.J. Dias 10*, 27/VII/1989 (UB s.n), **Palmeiras**, *L.S. Funch et al. 1540*, 15/XII/2002 (HUEFS 79768), **Piatã**, *M.L. Guedes et al. 16564*, 19/XII/2009 (ALCB 92694), **Salvador**, *alunos Bot. III s.n.*, 09/I/1993 (ALCB 19169), **Serra Geral**, *M.L. Guedes s.n.*, 28/IV/2003 (ALCB 62258), **próximo a Lençóis**, *R.J. Trad 67 & M.F.D.J. Trad*, 14/I/2010, (UEC 159015); DF: **Brasília**, *R.J. Trad 79 & M.B.S. Cortez*, 10/I/2010 (UEC 159026); GO: **Formosa**, *G. Ferreira Filho 68m*, 08/XII/1980 (UEC 34598); MG: **Congonhas do Norte**, *M.C.E. Amaral 93/5 & V. Bittrich*, 21/XII/1993 (UEC 117404), **Datas**, *G. Hatschbach 50244 & J.M. Silva*, 27/XI/1985 (UEC 120796), **Diamantina**, *H.F. Leitão Filho et al. 27518*, 08/XII/1992, (UEC 64400), **Serro**, *G. Hatschbach et al. 67463*, 24/XI/1997 (UEC 120827), **BR-259, perto do posto Kobu (Rede Brasil)**, *R.J. Trad 43 & M.F.D.J. Trad*, 18/XI/2009 (UEC 159089), **BR-259, perto do posto Kobu (Rede Brasil)**, *R.J. Trad 40 & M.F.D.J. Trad*, 18/XI/2009 (UEC 159086), **BR-259, perto do posto Kobu (Rede Brasil)**, *R.J. Trad 42 & M.F.D.J. Trad*, 18/XI/2009 (UEC 159088), **entre Gouveia e Curvelo**, *R.J. Trad 38 & M.F.D.J. Trad*, 18/XI/2009 (UEC 159084), **próximo a Matinha**, *G. Hatschbach et al. 67214*, 18/XI/1997 (UEC 120825); MT: **Diamantino**, *V.C. Souza et al. 16155*, 17/VI/1997(UEC 94447); TO: **TO-050, km 423**, *R.J. Trad et al. 113*, 14/XII/2010 (UEC 159054).

Não foi possível apresentar uma listagem de todo o material herborizado analisado. O número de identificações incorretas encontradas foi grande; como exemplo a coleção do UEC com cerca de 150 exsiccatas identificadas como *K. coriacea*, das quais aproximadamente 30 não pertencem a esta espécie e erros comuns como levantamentos apontando a ocorrência de *K. coriacea* quando se trata de *K. speciosa* A. St.-Hil. – uma espécie relativamente de fácil identificação uma vez que aprendida (Figura 6).

O gênero *Kielmeyera* representa um grande desafio aos taxonomistas uma vez que, de maneira geral, é possível notar grande semelhança morfológica entre as espécies. No caso da Série *Coriaceae* não foi diferente: *K. coriacea* e *K. grandiflora* são de difícil identificação para quem não está familiarizado com o grupo.

A dificuldade em ler latim ou alemão (as principais descrições elaboradas para essas espécies estão em um destes idiomas) e a impossibilidade de acesso à última revisão do gênero (grande parte do trabalho de Saddi de 1982 não foi publicada e existem duas cópias, uma em Reading – Inglaterra e outra em Cuiabá – Mato Grosso) causaram grande problema, uma vez que por *K. coriacea* ser considerada a espécie mais comum em cerrados, muitos identificam qualquer material de cerrado como sendo *K. coriacea*, quando o respectivo espécime pode pertencer a uma seção ou série completamente distinta.



Figura 6: Exemplo de material fotografado em herbário evidenciando um caso comum de identificação incorreta; o correto seria *K. grandiflora*.

### 1.5 – Floração

*K. grandiflora* geralmente apresenta um período de floração que vai de setembro ao início do mês de dezembro, enquanto *K. coriacea* subsp. *coriacea* apresenta floração concentrada nos meses de dezembro a fevereiro. Para *K. coriacea* subsp. *tomentosa* foi observada floração no mês de novembro.

Como ocorre sobreposição tanto de distribuição geográfica, quanto de floração e as flores são extremamente semelhantes, torna-se necessário um estudo a respeito de mecanismos da polinização e da biossistemática para elucidar se há algum fator que reduza a formação de híbridos. Caddah e Bittrich (comunicação pessoal) observaram nas populações estudadas em São Paulo uma sobreposição muito leve das florações, que com certeza reduz a formação de híbridos. Possivelmente ocorre, ainda, o aborto de frutos híbridos quando já há bastantes frutos mais velhos se formando (Bittrich comunicação pessoal).

#### 1.6 – Caracteres interessantes

A ocorrência de glândulas puntiformes no limbo foliar foi relatada por Saddi (1982, 1989), porém sua distribuição entre os grupos e sua localização não foi devidamente estudada. Até o momento, a ocorrência destas glândulas é frequente somente em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, podendo raramente estar presente também em *K. grandiflora* e em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, neste último caso somente em locais com tricomas ausentes.

Seria de grande utilidade compreender que tipo de substância é produzida por estas glândulas, a distribuição destas glândulas nas espécies e se apresentam alguma localização específica no limbo.

Outro caráter que merece observação é a distribuição dos tricomas na face abaxial; ela pode ser exclusivamente na nervura central ou em todas as nervuras. Não se sabe grau de informação que esse caráter pode trazer, porém caso associado à distribuição geográfica ou a alguma categoria taxonômica, pode ser de grande valia na identificação de material herborizado.

## 2 – Questões, além da diversidade morfológica, relacionadas ao complexo “*K. coriacea*”

### 2.1 – Quanto à descrição original de *K. coriacea* de Martius

Existem dúvidas a respeito do tipo apresentado; a ilustração não é muito clara nem detalhista e apresenta características tanto de *K. coriacea* (padrão de venação com distância maior entre as nervuras secundárias e folhas levemente bicolors) como de *K. grandiflora* (principalmente cor da flor). Segundo Bittrich (comunicação pessoal), as folhas

podem ser consideradas levemente glaucas, como o próprio Martius mencionou na descrição. Fornecendo suporte a esta hipótese, Caddah e colaboradores (2012) encontraram cera epicuticular do padrão *K. coriacea* no tipo. Há ainda erros, sendo os mais óbvios e evidentes representados pela coloração dos estames (eles possuem anteras amarelas e filetes verde-claros, o que difere muito do tom róseo ou avermelhado encontrado na ilustração, Figura 7) e pelo formato das pétalas (na grande maioria das vezes com laterais desiguais).

O tipo, o qual se encontra no herbário de Munique, apresenta folhas e ramos mais semelhantes aos de *K. coriacea*, porém o alargamento na base de um dos ramos de fato levanta a dúvida se este material não seria o de uma *K. grandiflora*; infelizmente não é possível afirmar nada a respeito da flor ou da inflorescência somente o com a foto do material (Anexo 1 – Figura 1).



Figura 7: Fotografia do tipo de *K. coriacea*, com folhas aparentemente típicas da espécie e inflorescência laxa, lembrando a de *K. grandiflora*.

Por essa grande quantidade de incerteza, mas também a considerável possibilidade de que a descrição tenha tratado de fato do que ficou conhecido posteriormente como *K. coriacea*, não acredito que seja relevante uma discussão visando decidir se o que atualmente é conhecido como *K. grandiflora* deveria ser chamado de *K. coriacea* e o que é conhecido como *K. coriacea* mereceria um nome novo.

Além disso, a hibridização entre as espécies é conhecida (Caddah 2009) e observações de campo e de material herborizado permitem a identificação de possíveis híbridos. No atual trabalho, indivíduos de *K. grandiflora* coletados em Sorocaba (SP) apresentaram flores de coloração rosa, branca ou uma mistura das duas cores (Figura 8) e no estudo sobre a polinização de *K. coriacea* realizado por Oliveira (1986) é possível notar que algumas das flores apresentam coloração rósea.

Uma vez que o esperado seria encontrar *K. grandiflora* com flores róseas e *K. coriacea* com flores brancas e, embora pouco frequentes, existem relatos de que ambas as espécies podem apresentar flores róseas e/ou alvas a cor floral não deve ser considerado um bom caráter para identificação destas espécies,



Figura 8: Indivíduo pertencente à população de *K. grandiflora* coletada em Sorocaba (SP) evidenciado que as flores podem não ser completamente róseas.

## 2.2 – Problemas com a delimitação das espécies

A ocorrência de variadas espécies simpatricamente foi observada durante o trabalho de campo no atual estudo (Figuras 9 A, B, C e D), sugerindo numerosas possíveis zonas de hibridização, tanto entre espécies como entre subespécies.



Figura 9: Registros de ocorrência simpátrica de diferentes espécies/subespécies de *Kielmeyera*. A. *K. grandiflora* e *K. rubriflora*. B e C. *K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *coriacea*. D. *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

Caddah (2009) mencionou grande dificuldade de identificação do material herborizado de *K. coriacea* e *K. grandiflora*. Cabe mencionar o trabalho de Stevens (1980) com o gênero *Calophyllum*. Nele o autor comenta a dificuldade de identificação das espécies pela existência clara de extremos (o que ele chamaria de espécies) e de algumas situações intermediárias. A importância desta situação se deve ao fato de *Calophyllum* pertencer à mesma família que *Kielmeyera* e por esta situação ter sido encontrada em folhas, como ocorre também no caso atual.

Na época, a associação de estudos genéticos com a taxonomia visando resolução de complexos de espécies ainda estava um pouco distante e não era fácil provar a hibridização entre espécies. Ainda assim, Stevens propôs que estas situações intermediárias fossem consideradas como híbridos uma vez que sua frequência era baixa.

Curiosamente, para *K. coriacea* e *K. grandiflora* a formação de híbridos foi constatada no trabalho de Caddah (2009), o que leva a crer que de fato as situações intermediárias encontradas podem ser consideradas resultantes de hibridização e não devem ser consideradas como a causa da continuidade dos caracteres entre as espécies de modo a impedir sua delimitação.

Suportando esta hipótese, é conhecida a rápida irradiação das Malpighiales (ver introdução) e das clusioides; sendo assim muitas espécies podem estar em processo de especiação e, assim, não apresentar impedimentos ao cruzamento e à formação de híbridos.

O atual trabalho investigou não só *K. grandiflora* e *K. coriacea*, mas também as subespécies e, quando possível, as variedades de *K. coriacea*. Nesse contexto cabe lembrar que uma das subespécies (*K. coriacea* subsp. *tomentosa*), encontrava-se na categoria de espécie (*K. tomentosa*) antes do trabalho de Saddi (1982), tornando a questão atual uma análise de três possíveis espécies.

Apesar de Saddi (1982) mencionar que *K. grandiflora* seria distinta de *K. coriacea* pelo padrão de venação foliar com as nervuras secundárias uniformemente paralelas e próximas entre si (a distância entre as nervuras secundárias seria menor que 3mm) e não arqueando na margem ou apenas indistintamente. O autor também cita a ausência de descontinuidade de caracteres para a manutenção de *K. tomentosa* como uma espécie, esquecendo que os espécimes intermediários observados entre *K. coriacea* e *K. tomentosa* são do mesmo tipo que os existentes com *K. grandiflora*. Além disso, não houve uma análise profunda a respeito da distribuição das espécies, o que permitiria a identificação de zonas de hibridação.

É inegável a existência de muitos problemas na revisão realizada por Saddi (1982), e no caso da Série *Coriaceae* provavelmente derivados de amostragem “viciada” e de as espécies ainda não estarem completamente estabelecidas (processo de especiação ocorrendo). Com relação à amostragem, ao analisar as coleções é possível notar que: grande parte do material não foi identificada por Saddi, em alguns casos há claros indícios de dúvida (anotações em exsicatas) e as coletas dele foram extremamente

concentradas no estado do Mato Grosso (pode não ter observado toda a variação morfológica da espécie).

A importância, sugerida no presente trabalho, em haver grande abrangência das coletas está relacionada a fatos curiosos observados:

- Bahia: não foi observada a ocorrência de *K. grandiflora*, houve maior dificuldade para encontrar as populações e muitos dos indivíduos apresentaram grande quantidade de folhas danificadas por herbívoros (o que foi muito raro nos outros estados), há ainda muitas áreas de transição entre cerrado/caatinga e cerrado/mata (Figura 10);



Figura 10: Indivíduo de *K. coriacea* com folhas muito afetadas pela herbivoria e repleto de formigas próximas aos botões.

- Mato Grosso: não foi encontrada *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, porém uma das populações de *K. grandiflora* não apresentou indivíduos com folhas glaucas (Figura 11), uma característica tida como típica para esta espécie e motivo pelo qual questionam a descrição original (há menção à glaucosidade das folhas), também ocorrem áreas de transição cerrado/pantanal e cerrado/mata;



Figura 11: Indivíduo de *K. grandiflora* com folhas não glaucas (sugerindo que a glaucosidade, caráter considerado extremamente útil na distinção de *K. coriacea* e *K. grandiflora*, pode não se apresentar sempre da mesma forma nas espécies).

- Minas Gerais e Diamantina (MG): foram encontrados indivíduos com tamanho foliar bem reduzido, podendo corresponder à variedade *K. microphylla* (Figuras 12 A e B), porém estes apresentaram folhas glaucas, semelhantes às de *K. grandiflora*, e padrão de venação mais “irregular”, semelhante ao de *K. coriacea*. O padrão de distribuição das espécies *K. grandiflora* e *K. coriacea* no estado foi interessante, havendo concentração da primeira na metade leste e da segunda na metade oeste, o que não impede a ocorrência de populações da outra espécie na metade dominada por uma delas. E possíveis indivíduos pertencentes ao que foi descrito por Cambessèdes como *K. tomentosa* foram coletados (Figura 13 A e B);

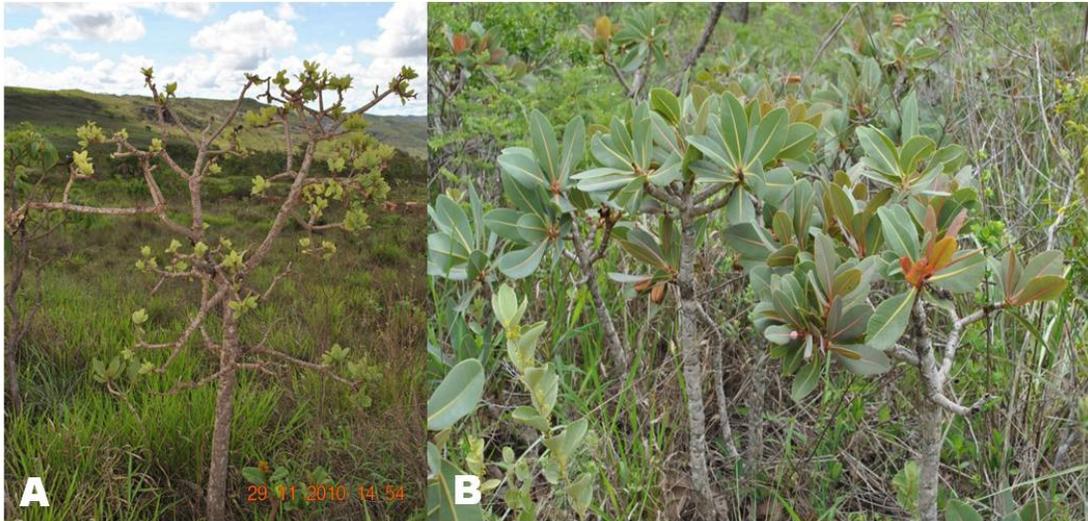


Figura 12: Indivíduos de *K. coriacea* com a folha anormalmente pequena; foram encontrados em estágio reprodutivo e de frutificação, gerando a dúvida a respeito do nanismo: seria uma consequência do ambiente ou um táxon distinto? A. Indivíduo adulto mostrando que as folhas realmente são muito reduzidas. B. Indivíduo de porte menor, com frutos pequenos e alguns destes maduros.



Figura 13: Possível representante de *K. tomentosa* descrita por Cambessèdes, atualmente incluída em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. Coleta realizada em Minas Gerais. A: Visão geral do espécime. B: Detalhe das folhas e flores.

- Goiás: uma das populações apresentou claramente características intermediárias à *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*, situação não relatada ou encontrada até então, mas que seria mais um indício da grande proximidade destas “três espécies”; além disto, foram observados indivíduos que poderiam também pertencer à variedade *K. microphylla*;

- Tocantins: foram coletados indivíduos de *K. coriacea* com folhas pecioladas (ca. 1 cm de comprimento), característica descrita por Saddi como rara para a espécie, muitas áreas de transição cerrado/mata;
- São Paulo: na coleta há indivíduos de *K. grandiflora* com flor de coloração rosa, branca e com mistura de ambas as cores (Figura 8).

### 3 – Considerações a respeito da morfologia

#### 3.1 – Complexo *K. coriacea*

Caddah (2009) relatou a dificuldade do uso de categorias infraespecíficas. Da mesma maneira, o presente estudo mostrou que para *K. coriacea* a validade destas categorias deve ser contestada.

Na divisão proposta de Saddi (1982), o autor considerou que as variedades seriam bastante semelhantes morfologicamente e muitas vezes apresentariam ocorrência simpátrica, porém ainda assim se considerava capaz de identificar os táxons.

Atualmente, estudos mostraram que espécies, mesmo distintas filogeneticamente, são capazes de formar híbridos caso estejam em simpatria. No caso das espécies do “complexo *K. coriacea*”, não só a simpatria como semelhanças morfológicas (hábito; se comparada com outras séries, as folhas também podem ser consideradas semelhantes; flores) e sobreposição de fenologia tornam mais propícia à geração de híbridos, já relatados por Caddah (2009) para *K. coriacea* e *K. grandiflora*.

No caso estudado os híbridos possivelmente adquirem morfologia intermediária, o que torna extremamente difícil a distinção de espécies (conforme observei em trabalho de campo). Uma vez que as espécies e subespécies são de difícil identificação nestas situações, torna-se um desafio identificar ao nível de variedade mesmo para um especialista no gênero.

As variedades atribuídas por Saddi são reconhecidas frequentemente com base em caracteres quantitativos, possivelmente contínuos e de interpretação subjetiva (p.ex., folhas tomentosas x folhas tomentulosas a esparsamente pilosas; nervuras pouco visíveis x nervuras fortemente visíveis, etc.), além de tamanho e forma das folhas e do número de flores na inflorescência e comprimento do pedúnculo.

A continuidade e a subjetividade dos caracteres sugerem que esta classificação não está adequada ao complexo. Aliado a isso, raramente são encontrados materiais em

herbários identificados até variedade; os únicos casos observados, foram identificações realizadas pelo próprio Saddi.

Até o momento não foi possível definir quantos “grupos” (possíveis espécies) existem no complexo *K. coriacea*, porém as variedades propostas por Saddi para *K. coriacea* subsp. *coriacea* não se mostraram válidas uma vez que, como mencionado acima, não há descontinuidade nos caracteres e há sobreposição de distribuição geográfica.

### 3.2 – *K. microphylla* ou formas “anãs” de espécies de *Kielmeyera*?

A variedade *microphylla* ainda não foi bem compreendida, pois há somente um material citado por Saddi (1982) para ela, é muito difícil encontrar exemplares nas coleções e relatos de sua ocorrência.

Neste trabalho, indivíduos com tamanho e órgãos reduzidos (folhas e frutos) foram encontrados não somente na região de Cristalina (GO), como esperado, mas também nas regiões de Alto Paraíso (GO), Diamantina (MG) e sul do Tocantins. Antes da revisão de Saddi, era reconhecida a espécie *K. microphylla* Pohl, porém tem sido comum o relato da ocorrência de plantas “anãs” de diferentes famílias em locais, cuja composição do solo apresenta quantidades elevadas de cobre, níquel, chumbo, cádmio, cromo, cobalto, manganês e ferro, também conhecidos como solos metalíferos (Porto & Silva 1990). Curiosamente, Diamantina, Cristalina e Alto Paraíso são locais conhecidos por apresentarem este tipo de solo.

Deste modo não é possível saber se *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *microphylla* deve ser novamente elevada à categoria de espécie ou se o tamanho reduzido é apenas uma variação morfológica da espécie. O nanismo tanto pode caracterizar uma espécie independente como ser um morfo de uma espécie. Uma vez que não foram realizados estudos moleculares visando comparar os indivíduos de tamanho reduzido do complexo *K. coriacea* com o restante das variedades, sugere-se uma investigação mais profunda, incluindo a coleta de ao menos uma população de plantas “anãs” em cada uma das localidades de ocorrência mencionadas, assim como a realização de trabalhos extensivos de campo visando determinar sua real distribuição, permitindo estudos mais detalhados a respeito de sua morfologia e fenologia.

### 3.3 – *K. tomentosa*?

Com relação à subsp. *tomentosa* a situação é mais complexa. É possível identificar em campo com certa facilidade os indivíduos, cuja identificação conforme Saddi (1982) seria *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. Considerando o *status* de espécie de *K. grandiflora* e o quanto esta espécie é semelhante a *K. coriacea*, há grande incoerência na manutenção de *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, visto que as três categorias (*K. coriacea* subsp. *coriacea*, *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*) apresentam consideráveis diferenças entre si.

Uma vez que a formação de híbridos é possível entre *K. coriacea* e *K. grandiflora*, o mesmo deve ocorrer com *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (ver capítulo 3). Desta forma, indivíduos com características intermediárias podem ser vistos como híbridos e os “extremos”, como as espécies, levando à proposição de *K. tomentosa*.

Porém a questão não envolve somente uma alteração de nível hierárquico, pois apesar de as variedades apresentarem sobreposição de caracteres e distribuição geográfica, indicando a pouca robustez destes grupos há, provavelmente, táxons distintos classificados como *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

Com relação à classificação de Saddi (1982), é interessante mencionar que há indivíduos identificados como pertencentes à variedade *intermedia* muitas vezes caracterizam situações intermediárias entre *K. coriacea* e o que seria *K. tomentosa*, sendo importante uma análise mais detalhada deste grupo, principalmente devido à possibilidade tanto desse grupo ser algo diferente, quanto de fazer parte de *K. coriacea* (neste caso como uma subespécie) ou ainda de ser uma situação híbrida. A variedade *pseudotomentosa* não foi encontrada em campo; a observação de material herborizado sugere que sejam realizadas mais coletas a fim de encontrar tal material uma vez que o pecíolo caracteristicamente longo chama a atenção. E a variedade *tomentosa* é a que apresenta maior complexidade, uma vez que é nela que estão incluídos indivíduos extremamente diferentes: o que provavelmente foi descrito por Cambessèdes e corresponde ao padrão 3 foliar e o deveria ter sido caracterizado juntamente com a variedade *intermedia*.

A presença ou ausência de tricomas na folha, caráter de extrema importância na distinção das subespécies conforme Saddi (1982) mostrou-se de utilidade limitada. Em uma mesma área foram observados indivíduos com a face abaxial foliar variando de glabra a densamente pilosa. Desta forma, sua utilização deve ser vista com cautela e

preferencialmente associada a um conjunto de caracteres para garantir a identificação correta.

Cambessèdes sugere a presença de tricomas no estilete como sendo um bom caráter para identificação de *K. tomentosa*, porém Saddi não analisou esse caráter e possivelmente incluiu na variedade tomentosa espécimes pertencentes a grupos taxonomicamente distintos, entre eles o que possivelmente correspondia à espécie descrita em 1828.

Até o momento a presença de tricomas no estilete é um caráter aparentemente inconstante: Bittrich (comunicação pessoal) notou indivíduos com folhas tomentosas e estilete glabro, assim como durante o trabalho de campo algumas populações floridas e com folhas tomentosas também não apresentaram tricomas no estilete. Porém é interessante analisar maior número de material para constatar a inconstância do caráter.

Considerando a delimitação dada por Saddi, o caráter mostrou-se inconstante e assim não poderia ser considerado diagnóstico para a subespécie, no caso. Entretanto dada a grande qualidade das descrições antigas, torna-se relevante a análise deste caráter considerando a circunscrição de *K. tomentosa* Cambess.

Cabe mencionar os fatos de Saddi (1982): ter citado, para diversas variedades, um número muito restrito de espécimes e ter realizado grande parte de seus trabalhos de campo no estado do Mato Grosso. Este último aspecto gera a possibilidade de interpretações incorretas ao criar uma “amostragem viciada”; as espécies e subespécies do da série *Coriaceae* apresentam distribuição ampla e coletas intensivas em estados nos quais ocorrem em simpatria poderiam ter permitido melhor compreensão do grupo.

#### 3.4 – *K. coriacea* subsp. *coriacea* x *K. grandiflora*

Apesar de Caddah (2009) alegar que a aparência da maior densidade das nervuras secundárias em *K. grandiflora* deve-se ao desenvolvimento mais forte de nervuras intersecundárias e que o padrão de nervação lateral nem sempre serve como caráter distintivo entre as duas espécies. Se for utilizado o conjunto de caracteres apresentado na descrição de padrões foliares há chances elevadas de identificação correta.

Como os demais caracteres avaliados por Caddah (2009) apresentam estados intermediários, possivelmente devido à introgressão entre as duas espécies, não se admira que o próprio Saddi tenha identificado espécimes incorretamente e,

aparentemente, muitas vezes desistiu de identificar espécimes depositados nos herbários que visitou.

### 3.2 – Situação atual do complexo

Os limites entre as possíveis espécies não foram completamente elucidados. Até o momento, a proposta é de reconhecimento de três espécies: *K. coriacea*, *K. grandiflora* e *K. tomentosa*. O suporte para tal foi obtido tanto a partir de dados de morfologia foliar e observações em trabalhos de campo quanto através da estrutura anatômica foliar e de genética populacional. Contudo para a completa compreensão é necessário determinar se o que foi incluído em *K. coriacea* subsp. *tomentosa* nas variedades *tomentosa*, *intermedia* e *pseudotomentosa* devem pertencer à circunscrição de *K. coriacea* ou deveriam ser incluídos em táxons distintos. A variedade *K. microphylla* merece atenção uma vez que há estudos indicando que o nanismo de plantas pode representar tanto casos de espécies distintas como não e deve ser estudada visando compreender se esta variedade deve ser elevada novamente à categoria de espécie. Para tal estudos de micromorfologia foliar (microscopia eletrônica de varredura) devem ser realizados antes da delimitação dos táxons; Caddah (2009) encontrou caracteres valiosos para a identificação de *K. coriacea* e *K. grandiflora* na estrutura da cera epicuticular.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS , K.L., QIU, Y.-L., STOUTEMYER, M. & PALMER, J.D. . 2002 . Punctuated evolution of mitochondrial gene content: High and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 99 : 9905-9912 .

APG II. 2003. An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141:399-436.

APG III . 2009 . An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105 – 121.

- BARKMAN, T.J., LIM, S-H. & NAIS, J. 2004. Mitochondrial DNA sequences reveal the photosynthetic relatives of *Rafflesia*, the world's largest flower Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 101:787–792.
- BITTRICH, V. 2003 Clusiaceae. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, v. 3, FAPESP: RiMa, São Paulo, pp 45-62.
- CADDAH, M.K., MAYER, J.L.S., AMARAL, M.C.E. & BITTRICH, V. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. Botanical Journal of the Linnean Society. 168: 101-115.
- CADDAH, M.K. 2009. Estudos Taxonômicos sobre o complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- CAMBESSÈDES, J. 1828. Ternstroemiaceae. In: Saint-Hillaire, A. Flora Brasiliae meridionalis, v. I, p. VIII. A. Belin, Paris, pp 296-310.
- CAMERON, K.M., CHASE, M.W., ANDERSON, W. R. & HILLS, H.G. 2001. Molecular systematics of Malpighiaceae: Evidence from plastid *rbcl* and *matK* sequences. American Journal of Botany. 88: 1847-1862.
- CHASE, M.W., SOLTIS, D.E., OLMSTEAD, R.G., MORGAN, D., LES, D.H., MISHLER, B.D., DUVALL, M.R., PRICE, R.A., HILLS, H.G., QIU, Y.L., KRON, K.A., RETTIG, J.H., CONTI, E., PALMER, J.D., MANHART, J.R., SYSTMA, K.J., MICHAELS, H.J., KRESS, W.J., KAROL, K.G., CLARK, W.D., HEDRE'N, M., GAUT, B.S., JANSEN R.K., KIM K.J., WIMPEE, C.F., SMITH, J.F., FURNIER, G.R., STRAUSS, S.H., XIANG, Q.Y., PLUNKETT, G.M., SOLTIS, P.S., SWENSEN, S.M., WILLIAMS, S.E., GADEK, P.A., QUINN, C.J., EGUIARTE, L.E., GOLENBERG, E., LEARN, G.H., GRAHAM, S.W., BARRET, S.C.H., DAYANANDAN, S. & ALBERT, V.A. 1993. Phylogenetics of seed plants—an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. Annals of Missouri Botanical Garden. 80:528–580.
- CHASE, M.W., ZMARTZY, S., LLEDÓ, M.D., WURDACK, K.J., SWENSEN, S.M. & FAY, M.F. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular analysis based on plastid *rbcl* sequences. Kew Bulletin. 57:141–181.
- CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of the flowering plants. New York. Columbia University Press.
- DAVIS, C.C. & CHASE, M.W. 2004. Elatinaceae are sister to Malpighiaceae; Peridiscaceae belong to Saxifragales. American Journal of Botany. 91: 262 – 273.

- DAVIS, C.C., ANDERSON, W. R. & DONOGHUE, M.J. 2001. Phylogeny of Malpighiaceae: Evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. *American Journal of Botany*. 88: 1830-1846.
- DAVIS, C.C., ANDERSON, W.R. & WURDACK, K.J. 2005a. Gene transfer from a parasitic flowering plant to a fern. *Proceedings of the Royal Society of London, B, Biological Sciences*. 272: 2237-2242.
- DAVIS, C.C., LATVIS, M., NICKRENT, D.L., WURDACK, K.J. & BAUM, D.A. 2007. Floral Gigantism in Rafflesiaceae. *Science*. 315: 1812 (incl. supporting online material).
- DAVIS, C.C., WEBB, C.O., WURDACK, K.J., JAMARILLO, C.A. & DONOGHUE, M.J. 2005b . Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-Cretaceous origin of tropical rain forests. *American Naturalist*. 165: E36-E65.
- ENGLER, A. 1888. Guttiferae (Clusiaceae). In Martius, C.F.Ph. von & Eichler, A.W. (eds.) *Flora brasiliensis*. Vol. XII, part I, fasc. 102.
- FAY, M.F., SWENSEN, S.S. & CHASE, M.W. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bulletin*. 52: 111 – 120.
- GREER, M. 2001. Single calanolide A doses safe for humans (HIV inhibitor being developed from *Calophyllum lanigerum*, Malaysian rain forest tree). June 18. *AIDS Weekly*.
- GUSTAFSSON, M.H.G., BITTRICH, V. & STEVENS, P.F. 2002. Phylogeny of Clusiaceae based on *rbcl* sequences. *International Journal of Plant Sciences*, 163: 1045-1054.
- HILU, K.W., BORSCH, T., MÜLLER, K., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., SAVOLAINEN, V., CHASE, M.W. *et al.* 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*. 90: 1758-1776.
- KATHRIARACHCHI, H., HOFFMANN, P., SAMUEL, R., WURDACK, K.J. & CHASE, M.W. 2005. Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae inferred from five genes (plastid *atpB*, *matK*, 3'*ndhF*, *rbcl* and nuclear *PHYC*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36: 112-134.
- KITA, Y. & KATO, M. 2001 .Intrafamilial phylogeny of the aquatic angiosperm Podostemaceae inferred from the nucleotide sequences of *matK* gene. *Plant Biology*. 3: 156-163.
- KOROTKOVA, N., SCHNEIDER, J.V., QUANDT, D., WORBERG, A., ZIZKA, G. & BORSCH, T. 2009. Phylogeny of the eudicot order Malpighiales: analysis of a recalcitrant clade with sequences of the *petD* group II intron. *Plant Systematics and Evolution*. 282: 201-228.

- KUBITZKI, K. & HOLST, B.K. 1998. Caraipa. In: Berry PE, Holst BK, Yatskievych K (eds.) Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 4. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. pp. 252-258.
- LITT, A. & CHASE, M.W. 1999. The systematic position of *Euphronia*, with comments on the position of *Balano.ps*: An analysis based on rbcL sequence data. Systematic Botany 23: 401-409.
- MAGALLÓN, S., CRANE, P.R. & HERENDEEN, P.S. 1999. Phylogenetic pattern, diversity and diversification of eudicots. Annals of the Missouri Botanical Garden. 86:297-372.
- MARTIUS, C.F.Ph. von & ZUCCARINI, J.G. 1825. Anzeigen. Flora 8:27-32.
- MARTIUS, C.F.Ph. von. 1826. Nova genera et species plantarum. Typis Lindaueri, München. V.I, p.IV.
- MESQUITA, M.L., PAULA, J.E., PESSOA, C., MORAES, M.O., COSTA-LOTUFO, L.V., GROUGNET, R. & MICHEL, S. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology. 123: 439-445.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy. Clarendon, Oxford.
- NOTIS, C .2004. Phylogeny and character evolution of Kielmeyeroideae (Clusiaceae) based on molecular and Morphological Data. MSc thesis, University of Florida.
- NÜRK, N.M. & BLATTNER, F.R. 2010. Cladistic analysis of morphological characters in *Hypericum* (Hypericaceae). Taxon. 59: 1495-1507.
- OLIVEIRA, P.E.A.M. 1986. Biologia de reprodução de espécies de *Kielmeyera* (Guttiferae) de cerrados de Brasília, DF. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVEIRA, P.E.A.M. & SAZIMA, M. 1990. Pollination biology of two species of *Kielmeyera*(Guttiferae) from brazilian cerrado vegetation. Plant Systematics and Evolution. 172: 35-49.
- POHL, J.B.E. 1830. Plantarum brasiliae icones et descriptiones hactenus ineditae. V. II, p. 2. Wien, Antonii Strauss.
- RUHFEL, B.R., BITTRICH, V., BOVE, C.P., GUSTAFSSON, M.H.G., PHILBRICK, C.T., RUTISHAUSER, R., XI, Z. & DAVIS, C.C. 2011. Phylogeny of the Clusioid clade (Malpighiales): Evidence from the plastid and mitochondrial genomes. American Journal of Botany. 98(2): 1-20.

- SADDI, N. 1982. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.
- SADDI, N. 1984a. A new combination in *Kielmeyera* (Guttiferae) Kew Bulletin. 39: 140.
- SADDI, N. 1984b. A new species of *Kielmeyera* (Guttiferae) from Peru. Kew Bulletin. 39: 741.
- SADDI, N. 1984c. Duas novas espécies do gênero *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Bradea 4: 27-30.
- SADDI, N. 1984d. Novas espécies de *Kielmeyera* Martius (Guttiferae) do sudeste brasileiro. Rodriguésia. 36: 59-64.
- SADDI, N. 1984e. Some new taxa in *Kielmeyera* (Guttiferae). Kew Bulletin. 39:b729-740.
- SADDI, N. 1984f. Uma nova espécie de *Kielmeyera* Martius endêmica do Paraná. Rodriguésia. 36: 43-44.
- SADDI, N. 1986. Novos táxons intraespecíficos no gênero *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Bradea. 4: 281-286.
- SADDI, N. 1987a. New species of *Kielmeyera* (Guttiferae) from Brazil. Kew Bulletin. 42: 221-230.
- SADDI, N. 1987b. Novitates *Kielmeyerae* brasilienses. Bradea. 4: 337-344.
- SADDI, N. 1989. Comparative external morphology study in the genus *Kielmeyera* Martius (Guttiferae). Publicações Avulsas do Herbário Central. 2: 1139.
- SAMUEL, R., KATHRIARACHCHI, H., HOFFMANN, P., BARFUSS, M.H.J., WURDACK, K.J., DAVIS, C.C. & CHASE, M.W. 2005. Molecular phylogenetics of Phyllanthaceae: Evidence from plastid matK and nuclear PHYC sequences. American Journal of Botany. 92: 132-141.
- SAVOLAINEN, V., CHASE, M.W., HOOT, S.B., MORTON, C.M., SOLTIS, D.E., BAYER, C., FAY, M.F. *et al.* 2000a. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. Systematic Biology. 49: 306-362.
- SAVOLAINEN, V., FAY, M.F., ALBACH, D.C., BACKLUND, A., BANK, M. van der, CAMERON, K.M., JOHNSON, S.A. *et al.* 2000b. Phylogeny of the eudicots: A nearly complete familial analysis based on rbcL gene sequences. Kew Bulletin. 55: 257-309.
- SCOTLAND, R.W., OLMSTAND, R.G. & BENNET, J.R.. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. Systematic Biology. 52: 539-548.
- SOLTIS, D.E., GITZENDANNER, M.A. & SOLTIS, P.S. 2007. A 567-taxon data set for angiosperms: The challenges posed by Bayesian analyses of large data sets. International Journal of Plant Sciences. 168: 137-157.

- SOLTIS, D.E., MORT, M.E., SOLTIS, P.S., HIBSCH-JETTER, C., ZIMMER, E.A. & MORGAN, D. 1999. Phylogenetic relationships of the enigmatic angiosperm family Podostemaceae inferred from 18S rDNA and rbcL sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11: 261-272.
- SOLTIS, D.E., SENTES, A.E., ZANIS, M.J., KIM, S., THOMPSON, J.D., SOLTIS, P.S., RONSE DE CRAENE, L.P. *et al.* 2003. Gunnerales are sister to other core eudicots: Implications for the evolution of pentamery. *American Journal of Botany*. 90: 461-470.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., CHASE, M.W., MORT, M.E., ALBACH, D.C., ZANIS, M., SAVOLAINEN, V., HAHN, W.H., HOOT, S.B., FAY, M.F., AXTELL, M., SWENSEN, S.M., PRINCE, L.M., KRESS, W.J., NIXON, D.C. & FARRIS, J.S.. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 381-461.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S., ENDRESS, P.K. & CHASE, M.W. 2005. *Phylogeny and evolution of angiosperms*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2008. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum. Nova Odessa.
- STEVENS, P.F. 1980. A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61: 117-690.
- STEVENS, P.F. 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. November 2011. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- STEVENS, P.F. 2007. Clusiaceae. In: Kubitzki (ed.). *The families and genera of vascular plants*. Springer Verlag, Viena. v 9
- SWEENEY, P.W. 2008. Phylogeny and floral diversity in the genus *Garcinia* (Clusiaceae) and relatives. *International Journal of Plant Sciences*. 169: 1288-1303.
- TAKHTAJAN, A. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. New York. Columbia University Press.
- THIV, M., GHOGUE, J.-P., GROB, V., HUBER, K., PFEIFER, E. & RUTISHAUSER, R. 2009. How to get off the mismatch at the generic rank in African Podostemaceae? *Plant Systematics and Evolution*. 283: 57-77.
- TOKUOKA, T. & TOBE, H. 2006. Phylogenetic analyses of Malpighiales using plastid and nuclear DNA sequences, with particular reference to the embryology of Euphorbiaceae sens. str. *Journal of Plant Research*. 119: 599- 616.

- TOKUOKA, T. 2007. Molecular phylogenetic analysis of Euphorbiaceae *sensu stricto* based on plastid and nuclear DNA sequences and ovule and seed character evolution. *Journal of Plant Research*. 120: 511-522.
- TOKUOKA, T. 2008. Molecular phylogenetic analysis of Violaceae (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Journal of Plant Research*. 121: 253-260.
- VASQUEZ, R. 1993. Una Nueva *Haploclathra* (Clusiaceae) de la Amazonía Peruana. *Novon* 3: 499-501.
- VELLOZO, J.M. da C. 1829 (1825). *Florae Fluminensis*. Typographia nationali, Rio de Janeiro.
- WAWRA, H. 1886. Ternstroemiaceae. In: Martius, C.F.Ph. von, Eichler, A.G., Urban, I. *Flora brasiliensis*, v.12. Frid. Fleischer, Lipsiae.
- WEITZMAN, A.L. & STEVENS, P.F. 1997. Notes on the circumscription of Bonnetiaceae and Clusiaceae, with taxa and new combinations. *BioLlania*, Edición Especial. 6: 551-564.
- WING. S. (coord.). 1999. Manual of leaf architecture - morphological description and categorization of dicotyledonous and net-veined monocotyledonous angiosperms by Leaf Architecture Working Group. Smithsonian Institution, Wasington. 65p.
- WURDACK, K.J. & DAVIS, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany*. 96: 1551-1570.
- WURDACK, K.J. 2002. Molecular systematics and evolution of Euphorbiaceae *sensu lato*. Ph.D. dissertation, University of North Carolina at Chapel Hill. Chapel Hill, North Carolina, USA.
- WURDACK, K.J., HOFFMANN, P. & CHASE, M.W. 2005. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using plastid *rbcL* and *trnL-F* sequences. *American Journal of Botany*. 92: 1397-1420.
- WURDACK, K.J., HOFFMANN, P., SAMUEL, R., BRUJIN, A. de, BANK, M. van der & CHASE, M.W. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Phyllanthaceae (Phyllanthoideae pro parte, Euphorbiaceae *sensu lato*) using plastid *rbcL* DNA sequences. *American Journal of Botany*. 91: 1882-1900.
- ZHANG, L.-B. & SIMMONS, M.P. 2006. Phylogeny and delimitation of the Celastrales inferred from nuclear and plastid genes. *Systematic Botany* 31: 122-137.
- ZHU, X.Y., CHASE, M.W., QIU, Y.L., KONG, H.Z., DILCHER, D.L., LI, J.H. & CHEN, Z.D. 2007. Mitochondrial *matR* sequences help to resolve deep phylogenetic relationships in rosids. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 217.

## **CAPÍTULO 2**

**Estrutura foliar de *Kielmeyera coriacea* subsp. Mart. & Zucc. *coriacea*, *K. coriacea* Mart. & Zucc. subsp. *tomentosa* (Cambess.) Saddi e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi**

## INTRODUÇÃO

Estudos de anatomia vegetal permitem caracterizar a estrutura interna das plantas e tem sido de grande importância tanto na determinação das relações filogenéticas como na identificação de táxons (Judd *et al.* 2009). Uma das primeiras tentativas de utilização de caracteres anatômicos na taxonomia foi a de Radlkofer para o gênero *Serjania* (Sapindaceae) em 1896 (Metcalf & Chalk 1979). Observando essa data e realizando uma busca em periódicos é possível perceber que recentemente houve um aumento na quantidade de estudos envolvendo anatomia e taxonomia (Meinzer *et al.* 1999, Bieras & Sajo 2004, Oliveira *et al.* 2003, Proença & Sajo 2007, Palhares & Zaidan 2010, Pereira *et al.* 2003, Alves *et al.* 2002, Gomes *et al.* 2009 e Caddah *et al.* 2012).

Especialmente no caso de plantas do cerrado e taxonomicamente próximas, a anatomia foliar tem auxiliado a identificação de espécies difíceis de distinguir apenas com base em características morfológicas (Meinzer *et al.* 1999, Bieras & Sajo 2004, Oliveira *et al.* 2003, Proença & Sajo 2007, Palhares & Zaidan 2010, Pereira *et al.* 2003, Alves *et al.* 2002 e Gomes *et al.* 2009). A maioria dos estudos de cerrado são relacionados a sua florística ou tem natureza fitossociológica (Leitão Filho 1992; Durigan *et al.* 1994; Bicudo *et al.* 1996; Castro & Martins 1999; Castro *et al.* 1999; Ribeiro & Tabarelli 2002; Tannus & Assis 2004) e apesar da grande quantidade de espécies típicas, pouco se sabe a respeito da anatomia foliar de seus representantes (Bieras & Sajo 2009).

Entre as grandes contribuições nesta área podem ser citados Morretes (1967, 1969) e Morretes e Ferri (1959), que descreveram a anatomia de um número considerável de espécies. Recentemente alguns estudos, como Sajo e Rudall (2002) e Bieras e Sajo (2004), tem buscado identificar adaptações em plantas cujas famílias são bem representadas no cerrado.

As características xeromorfas como superfície com indumento, cutícula espessa, epiderme papilosa e estômatos em cavidades ou protegidos por tricomas mencionadas por Ferri (1944) também foram observadas por Morretes e Ferri (1959). Porém são poucos os exemplos que descrevem a superfície foliar (Bieras & Sajo 2009).

Scotland e colaboradores (2003) realmente apoiam a utilização de caracteres anatômicos após estudos críticos e rigorosos da morfologia. Alguns desses estudos podem ser realizados com o uso de técnicas relativamente simples o que os torna atrativos e interessantes (Judd *et al.* 2009).

Por serem muito variadas morfológica e anatomicamente, as folhas fornecem diversos caracteres importantes e úteis na sistemática (Judd *et al.* 2009). Existem poucos estudos anatômicos com espécies de Calophyllaceae (Metcalf & Chalk 1950, Stevens 1974, Figueiredo *et al.* 1971, Notis 2004, Caddah *et al.* 2012), mas essa pequena quantidade de dados já indica grande potencial de caracteres para melhor identificação das espécies. Notis (2004) teve uma boa surpresa ao utilizar a anatomia do limbo e do pecíolo foliares como fonte de caracteres para a filogenia de Kielmeyeroideae; de um total de 16 caracteres levantados 13 foram informativos.

Curiosamente uma das questões que oferece grande desafio à taxonomia, a formação de híbridos entre espécies próximas, também pode ser melhor compreendida através de estudos das anatomia foliar (Silva & Potiguara 2008). Os caracteres anatômicos dos órgãos vegetativos das plantas servem como dados adicionais às características morfológicas externas podendo ser usados para resolver problemas taxonômicos (Metcalf & Chalk 1983).

A dificuldade de identificação de *Kielmeyera* através de material herborizado devido à grande semelhança na morfolgia floral e foliar entre algumas espécies também é apontada para o gênero *Calophyllum* (D'Arcy & Keating 1979), pertencente à mesma família. Para estes casos a anatomia foliar pode ser uma ferramenta poderosa e seus resultados de grande valor (Vesque 1889, 1893; Schofield 1968; Stevens 1974, 1976, Notis 2004, Caddah *et al.* 2012).

A família Guttiferae (*Kielmeyera* ainda estava incluída em Clusiaceae s.l. nesta época) apresenta certa uniformidade anatômica (Metcalf & Chalk 1950, Stevens 1980). Conforme Stevens (1974) o tipo da nervura central e o grau de proeminência das nervuras estão associados a características da estrutura anatômica que podem ser identificadas em cortes foliares.

As Clusiaceae s.l. se caracterizam anatomicamente por suas estruturas secretoras esquizógenas, geralmente na forma de canais ou, menos frequentemente, cavidades. Nas folhas de algumas espécies as cavidades secretoras são mais frequentes que canais e a maneira como os canais e cavidades se distribuem é de algum valor taxonômico, porém é importante considerar a ocorrência de variações em quantidade de estruturas nas espécies relacionadas ao ambiente (Metcalf & Chalk 1950). Os canais podem ocorrer próximos aos tecidos vasculares ou se encontrar livres no mesófilo; também estão presentes nas regiões medulares e corticais dos pecíolos (Metcalf & Chalk 1950).

Para *K. coriacea* especificamente, há apenas 2 estudos (Figueiredo *et al.* 1971, Caddah 2009 e Caddah *et al.* 2012), sendo um deles extremamente recente. Figueiredo e colaboradores (1971) descrevem a estrutura de *K. coriacea* mencionando diferenças estruturais relacionadas ao grau de maturidade foliar, conforme pode ser observado no trecho “os feixes vasculares são acompanhados quase que em sua extensão total por bainhas de células de paredes muito espessadas, dispostas principalmente sobre e sob os feixes vasculares. Em folhas jovens de *K. coriacea* observa-se a ausência de células esclerificadas acompanhando os feixes vasculares, além de um grande número de elementos xilêmáticos em algumas terminações”.

Os gêneros de Kielmeyeroideae geralmente são caracterizados pela presença de cavidades ou canais secretores, mas não de ambos (Stevens 2007); esta situação já havia sido reportada para *Kielmeyera* por Solereder (1908) e recentemente foi observada por Caddah e colaboradores (2012).

Tendo em vista a crescente importância da anatomia foliar no estudo de espécies próximas e de difícil identificação e o interesse na estrutura geral de folhas de plantas do cerrado, a estrutura anatômica foliar de populações de duas subespécies de *Kielmeyera coriacea* (senso Saddi 1982) foi estudada visando complementar os estudos iniciados por Caddah (2009) e permitir uma melhor compreensão deste complexo de espécies.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas 5 populações, compostas por dois indivíduos cada uma. Desse total, duas populações foram de *K. coriacea* subsp. *coriacea*, duas de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e uma de *K. grandiflora*. Os locais de coleta e as identificações estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Identificação, origem dos indivíduos utilizados no trabalho, comprimento foliar e região isolada para realização dos estudos anatômicos organizados por população.

População	Indivíduo	Espécie	Subsp.	Localidade	Comprimento da folha (cm)	Região seccionada (cm)
1	P9i17	<i>K. coriacea</i>	<i>tomentosa</i>	Minas Gerais	10,8	4,9 - 5,9
	P9i20	<i>K. coriacea</i>	<i>tomentosa</i>	Minas Gerais	13,1	6,05 – 7,05
2	P15i6	<i>K. coriacea</i>	<i>tomentosa</i>	Bahia	16,4	7,7 – 8,7
	P15i10	<i>K. coriacea</i>	<i>tomentosa</i>	Bahia	13,7	6,35 – 7,35
3	P1Ai2	<i>K. coriacea</i>	<i>coriacea</i>	Goiás	15,4	7,2 – 8,2
	P1Ai3	<i>K. coriacea</i>	<i>coriacea</i>	Goiás	13,6	6,3 – 7,3
4	MSi1	<i>K. coriacea</i>	<i>coriacea</i>	Mato Grosso do Sul	20,2	9,6 – 10,6
	MSi2	<i>K. coriacea</i>	<i>coriacea</i>	Mato Grosso do Sul	17,4	8,2 – 9,2
5	P8i25	<i>K. grandiflora</i>	-	Minas Gerais	13,0	6,0 – 7,0
	P8i23	<i>K. grandiflora</i>	-	Minas Gerais	8,6	3,8 – 4,8

As folhas de cada indivíduo foram fixadas, por um período de 48 horas, em solução de formaldeído, ácido acético e álcool etílico 50% (FAA 50, na proporção 1:1:18) (Johansen 1940), formalina neutra tamponada (FNT, Lillie 1948 in Clark 1973) e sulfato ferroso em formalina (SFF, Johansen 1940). O material foi mantido em bomba de vácuo para a retirada de ar dos tecidos e posteriormente foram realizadas as lavagens em água e a série de desidratação alcoólica até álcool etílico 70%, no qual foram estocados. Somente o material fixado em FAA foi utilizado nas etapas que se seguem.

Foi isolada da região mediana do limbo uma amostra de 1 cm de altura (Figura 1). Dessa amostra foram isoladas 3 regiões, com 0,5 cm de largura e 0,5 cm de altura cada: uma amostra de cada uma das margens e uma da região central. As três porções foram desidratadas em série butílica conforme Johansen (1940). Neste caso, as trocas foram realizadas a cada 48 horas e o material permaneceu cerca de 21 dias em solução de álcool butílico 70% (para amolecimento das folhas coriáceas) até que fosse dada sequência ao protocolo até a inclusão em Paraplast Plus (McCormick Sscientific, REF: 502004).

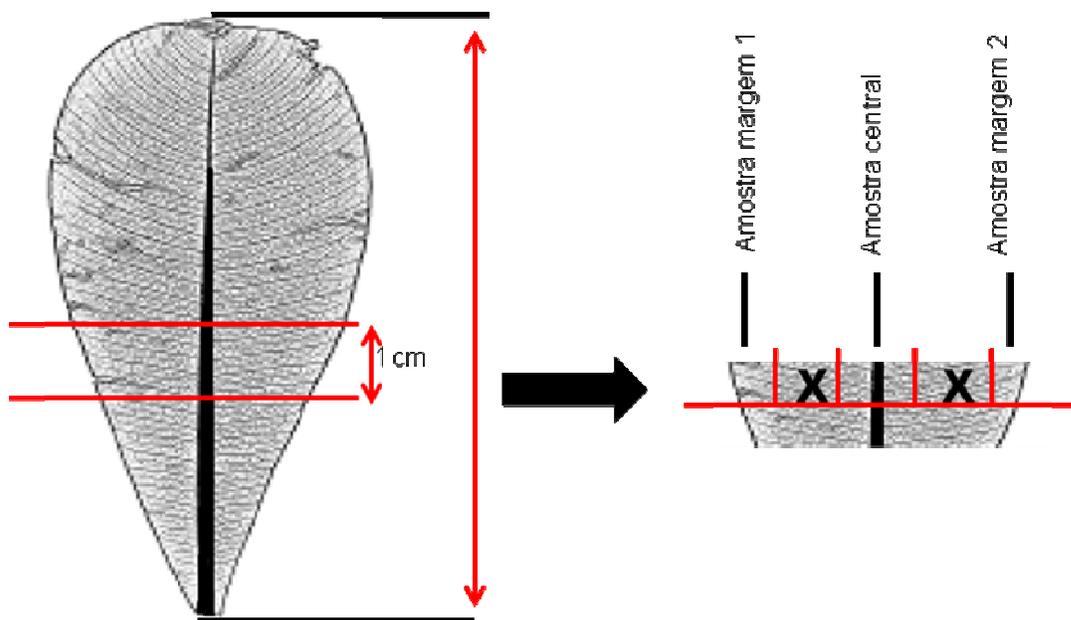


Figura 1: Esquema indicando as regiões que foram coletadas para as análises anatômicas.

Depois da infiltração, foram confeccionados blocos e estes, após aderidos em suportes de madeira, foram seccionados, com a espessura de 10  $\mu$ M, em micrótomo rotativo para geração de lâminas.

As secções foram desparafinizadas com xilol, desidratadas e coradas com safranina em solução alcoólica 1% e azul de astra em solução aquosa 1% (Gerlach 1969). Os tempos de coloração variaram de 45 minutos a 1:30 hora na safranina e 1-5 minutos no azul de astra.

As lâminas foram fotografadas com o auxílio do microscópio (Olympus BX51 com câmera acoplada DP71) e as imagens analisadas de modo a permitir a elaboração de descrições da estrutura básica das subespécies estudadas.

## RESULTADOS

### 1. Descrição de *Kielmeyera coriacea* subsp. *tomentosa*

A nervura central é bem saliente na face abaxial e apresenta feixe vascular com forma pentagonal em secção transversal (Figura 2 A). Exteriormente à epiderme há uma camada espessa de cutícula aderida à parede das células epidérmica e corada em vermelho (Figura 2 E).

A epiderme é uniestratificada em ambas as faces foliares (Figuras 2 A). Na região da nervura central, as células epidérmicas apresentam-se com forma diferente, lembrando o formato papiloso (Figura 2 D).

Internamente à epiderme é frequente a presença de uma camada de esclerênquima, a qual pode ser descontínua. Essa camada é composta por células de forma cuboide, de parede espessa e lignificada, corada em vermelho (Figura 2 D) e evidente em observação no microscópio sob luz polarizada (Figura 5 A). Esta camada de esclerênquima pode apresentar-se ausente em indivíduos jovens (dados analisados, mas não apresentados).

Mais interna a essa camada celular há de uma a quatro camadas de colênquima, caracterizadas por células coradas em roxo escuro e com paredes primárias irregularmente espessadas (Figuras 2 A e D). Internamente há numerosas camadas de parênquima. As células parenquimáticas apresentam-se menos coradas que as colenquimáticas e têm forma isodiamétrica (Figura 2 A).

Por fim, internamente encontra-se o feixe vascular colateral (Figura 2 A). Ao redor do feixe vascular e no parênquima interno há canais ou cavidades secretoras.

A região entre a nervura central e a margem constitui o limbo. Nele a epiderme é uniestratificada e composta por células de forma tabular, exceto em regiões de nervura secundária de grande calibre; nestas porções as células epidérmicas assemelham-se às da nervura central (Figura 2 C). Internamente à epiderme não há camadas de células esclerenquimáticas ou colenquimáticas (Figuras 2 C).

A região do limbo possui mesofilo dorsiventral, composto por uma a duas camadas de parênquima paliçádico, com as células estreitas e alongadas e com poucos espaços intercelulares (Figura 2 C). O parênquima lacunoso é composto por células pequenas e de forma irregular em secção transversal. Esse tecido é caracterizado pela presença de amplos espaços intercelulares (Figura 2 C).

Nesta subespécie os estômatos encontram-se restritos à face abaxial e o parênquima lacunoso é repleto de amplas câmaras subestomáticas características (Figuras 2 C e 6 A).

Os feixes vasculares distribuídos ao longo do limbo (fora da região da nervura central) são sustentados por esclerênquima. A bainha do feixe estende-se para ambas as faces (Figuras 5 E e 6 A) e pode apresentar canais.

Por fim, a região marginal caracteriza-se por apresentar, em secção transversal, a extremidade com formato arredondado e alargado (Figura 2 B). A epiderme da região

marginal, assim como descrito para a região central e para o limbo, é composta por células com formato tabular recobertas por uma cutícula espessa (Figuras 2 B).

Internamente à epiderme há duas ou mais camadas de esclerênquima, podendo este tecido preencher praticamente toda a extremidade marginal (Figuras 2 B e 5 B), o que é característico para esta subespécie. Adjacente a esta região é possível observar uma estrutura semelhante à do limbo foliar, com mesofilo dorsiventral evidente (Figura 2 B).

Contradizendo as descrições morfológicas, foram observados tricomas com pouca frequência tanto na face adaxial como na abaxial, o que foi observado também em materiais herborizados. Os tricomas são simples e pluricelulares em todos os espécimes analisados (Figura 2 E) e sua distribuição ocorreu principalmente em possíveis regiões de nervuras e, nesses casos, sempre associados à presença de esclerênquima interno à epiderme.

Em visão paradérmica pode-se observar os estômatos paracíticos na epiderme (Figura 4 B) e a presença de cavidades e canais secretores em toda a região do limbo (Figuras 4 A, C e F). Há ainda idioblastos e drusas (Figura 6 C) distribuídos por toda a folha.

## 2. Descrição de *Kielmeyera coriacea* subsp. *coriacea*

A região da nervura central apresenta-se bem saliente na face abaxial e tem o feixe vascular com forma triangular em secção transversal (Figura 3 A). A epiderme é uniestratificada e revestida por uma cutícula espessa (Figura 3 G).

Na nervura central as células epidérmicas apresentam-se com forma diferente, lembrando o formato papiloso (Figura 3 G); o mesmo foi observado para as outras espécies do complexo.

Na região central, internamente à epiderme há de uma a quatro camadas de colênquima, caracterizadas por células coradas em roxo escuro e com paredes primárias irregularmente espessadas (Figura 3 G). A camada de esclerênquima presente entre a epiderme e o colênquima encontra-se ausente nesta subespécie.

Internamente há numerosas camadas de parênquima. As células parenquimáticas são isodiamétricas e se mostram menos coradas que as colenquimáticas (Figuras 3 A e G). Na porção mais interna da região central encontra-se o feixe vascular colateral e um

parênquima central (Figura 3 A). Ao redor do feixe vascular e no parênquima interno há canais ou cavidades secretores.

O limbo apresenta epiderme uniestratificada e composta por células com formato tabular em ambas as faces foliares (Figuras 3 A, C e E), exceto quando há nervuras secundárias ou terciárias salientes (situação pouco frequente em indivíduos de *K. coriacea* subsp. *coriacea*).

O mesofilo é dorsiventral e formado por uma a duas camadas de parênquima paliçádico, com as células estreitas e alongadas e justapostas (Figura 3 E). Internamente a esta camada há o parênquima lacunoso composto, nesta subespécie, por células semelhantes às do parênquima paliçádico. As células são alongadas, porém há mais espaço intercelular neste tecido (Figura 3 E).

Nesta subespécie os estômatos encontram-se distribuídos tanto na face adaxial quanto na abaxial (Figura 6 B) e as câmaras subestomáticas apresentam tamanho bem inferior quando comparadas com as da subespécie *tomentosa* (comparar as Figuras 6 A e B). Apesar da presença de espaços intercelulares no parênquima lacunoso, estes são bem reduzidos se comparados aos do mesmo tecido da subespécie *tomentosa* (Figuras 2 C e 3 E).

Os feixes vasculares distribuídos ao longo do limbo (fora da região da nervura central) são sustentados por uma bainha esclerenquimática que se estende de uma face foliar a outra (Figuras 5 F e 6 B). Há cavidades e canais secretores (Figuras 4 D e F), idioblastos e drusas distribuídos por todo o limbo. Os idioblastos concentram-se próximos aos feixes vasculares.

A região marginal desta subespécie caracteriza-se por apresentar, em secção transversal, uma extremidade que se torna mais afilada no sentido da extremidade (Figura 3 C). A epiderme é uniestratificada e composta por células com formato tabular (Figura 3 E). Internamente à epiderme não há células colenquimáticas (Figuras 3 C e E), diferentemente do que ocorre na região central.

Em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, as extremidades das regiões marginais apresentam-se quase completamente compostas por idioblastos (Figuras 3 C e 5 D), havendo canais ou cavidades distribuídos neste tecido. Adjacente à extremidade marginal é possível notar a organização dos tecidos de maneira semelhante à do limbo (Figura 3 C). Nesta subespécie não foram observados tricomas.

A secção paradérmica assemelha-se muito à da subespécie *tomentosa*, com estômatos paracíticos (Figura 4 D) e cavidades evidentes (Figura 4 E).

### 3. Descrição de *Kielmeyera grandiflora*

A região central apresenta a nervura central menos saliente na face abaxial que nas duas subespécies de *K. coriacea* e feixe vascular com forma elipsóide em secção transversal (Figura 3 B).

A epiderme é uniestratificada e composta por células de forma semelhante à papilosa e são recobertas por uma cutícula espessa (Figura 3 B e H). Internamente à epiderme há de uma a quatro camadas de colênquima, caracterizadas por células coradas em roxo escuro e com paredes primárias irregularmente espessadas (Figura 3 H). A camada de esclerênquima presente entre a epiderme e o colênquima encontra-se ausente nesta espécie.

Internamente há numerosas camadas de parênquima. As células parenquimáticas assemelham-se as descritas para os outros dois táxons (Figura 3 H). Na porção mais interna da região central encontra-se o feixe vascular colateral, que pode apresentar, interna ou externamente, canais ou cavidades secretores (Figura 3 B).

O limbo apresenta as duas faces revestidas por células epidérmicas tabulares (Figuras 3 F). Quando há nervuras secundárias ou terciárias mais salientes (raro em indivíduos de *K. grandiflora* e semelhante ao observado em *K. coriacea* subsp. *coriacea*); as células epidérmicas apresentam-se como na nervura central (Figura 3 H).

O mesofilo dorsiventral apresenta internamente à epiderme o parênquima paliçádico, composto por uma a duas camadas de células alongadas e estreitas, com espaços intercelulares reduzidos (Figura 3 F). Internamente há o parênquima lacunoso, composto nesta espécie por células semelhantes às do parênquima paliçádico. As células também são alongadas, porém há mais espaço intercelular neste tecido (Figuras 3 D e F).

Nesta espécie, assim como ocorre em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, os estômatos encontram-se distribuídos nas duas faces foliares e as cavidades subestomáticas são pequenas. Os espaços intercelulares do parênquima lacunoso são semelhantes aos de *K. coriacea* subsp. *coriacea* (Figuras 3 F).

Os feixes vasculares distribuídos ao longo do limbo (fora da região da nervura central) são sustentados por esclerênquima. Este tecido estende-se de uma face foliar a outra e envolve o feixe, sendo composto por uma bainha e suas extensões (Figura 3 F).

A região marginal desta espécie caracteriza-se por apresentar, em secção transversal, a extremidade com formato circular, porém mais delgado que o apresentado por indivíduos de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (Figura 3 D).

A epiderme da região marginal, assim como descrito para a região central, é composta por células com formato tabular (Figuras 3 D). A constituição celular e a estrutura da extremidade da margem assemelham-se ao que é observado em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, também sendo compostas quase inteiramente por idioblastos (Figura 3 D).

Assim como em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, há cavidades e canais secretores, idioblastos e drusas distribuídos por todo o limbo. Os idioblastos concentram-se próximos aos feixes vasculares e na extremidade da região marginal (Figura 3 D). Não foram observados tricomas nesta espécie.

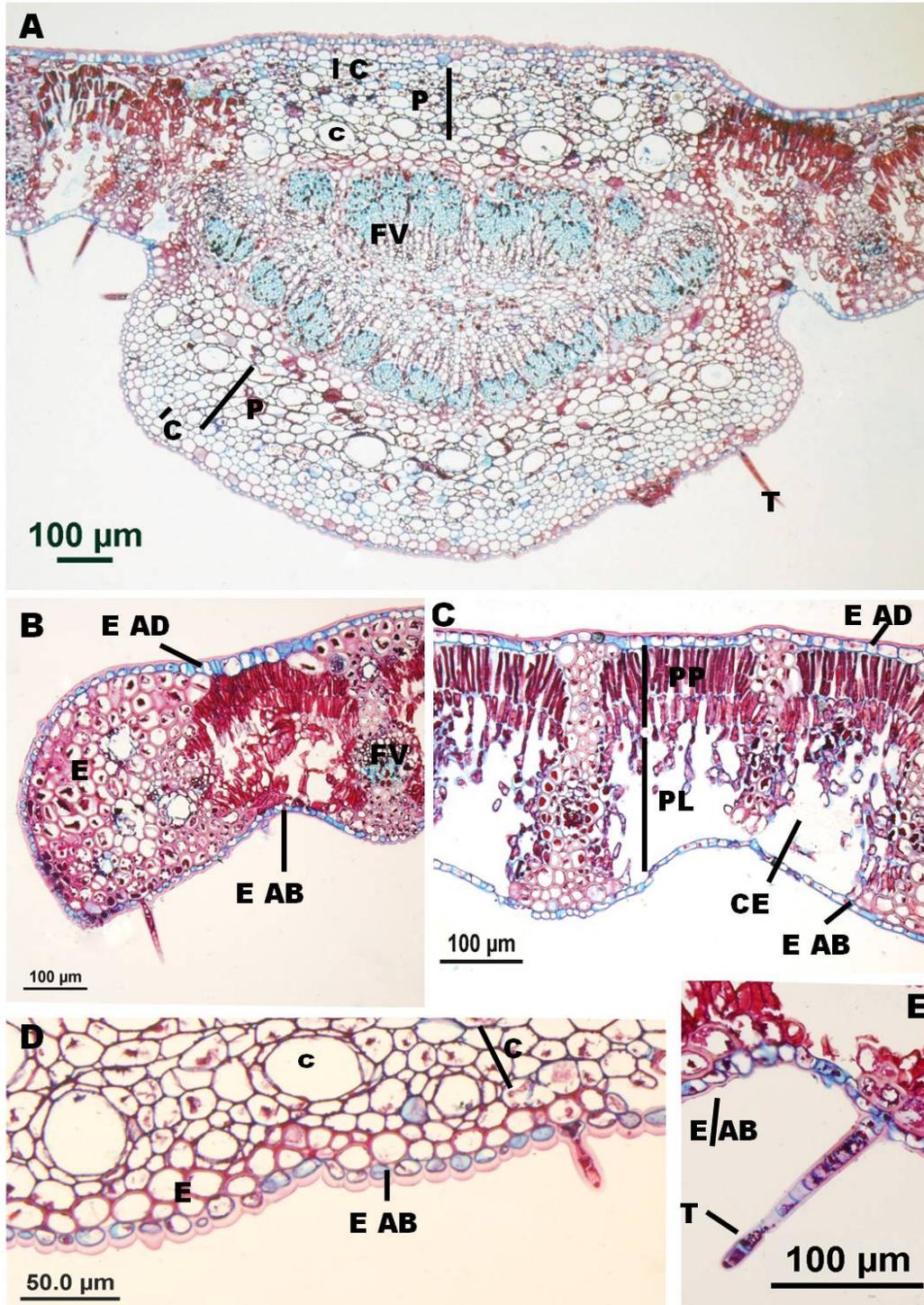


Figura 2: Secções transversais de *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. A e D. Região da nervura central. B, C e E. Região marginal. A. Evidenciando a organização dos feixes vasculares na região da nervura. B. Extremidade da região marginal evidenciando a presença de muitas camadas de esclerênquima. C. Detalhe do limbo foliar. D. Detalhe evidenciando o formato das células epidérmicas. E. Detalhe do tricoma simples e pluricelular. (FV – feixe vascular, C – colênquima, P – parênquima, E AD – epiderme adaxial, E AB – epiderme abaxial, PP – parênquima paliádico, PL – parênquima lacunoso, CE – cavidade estomática, c – canal/cavidade secretor(a), T – tricoma)

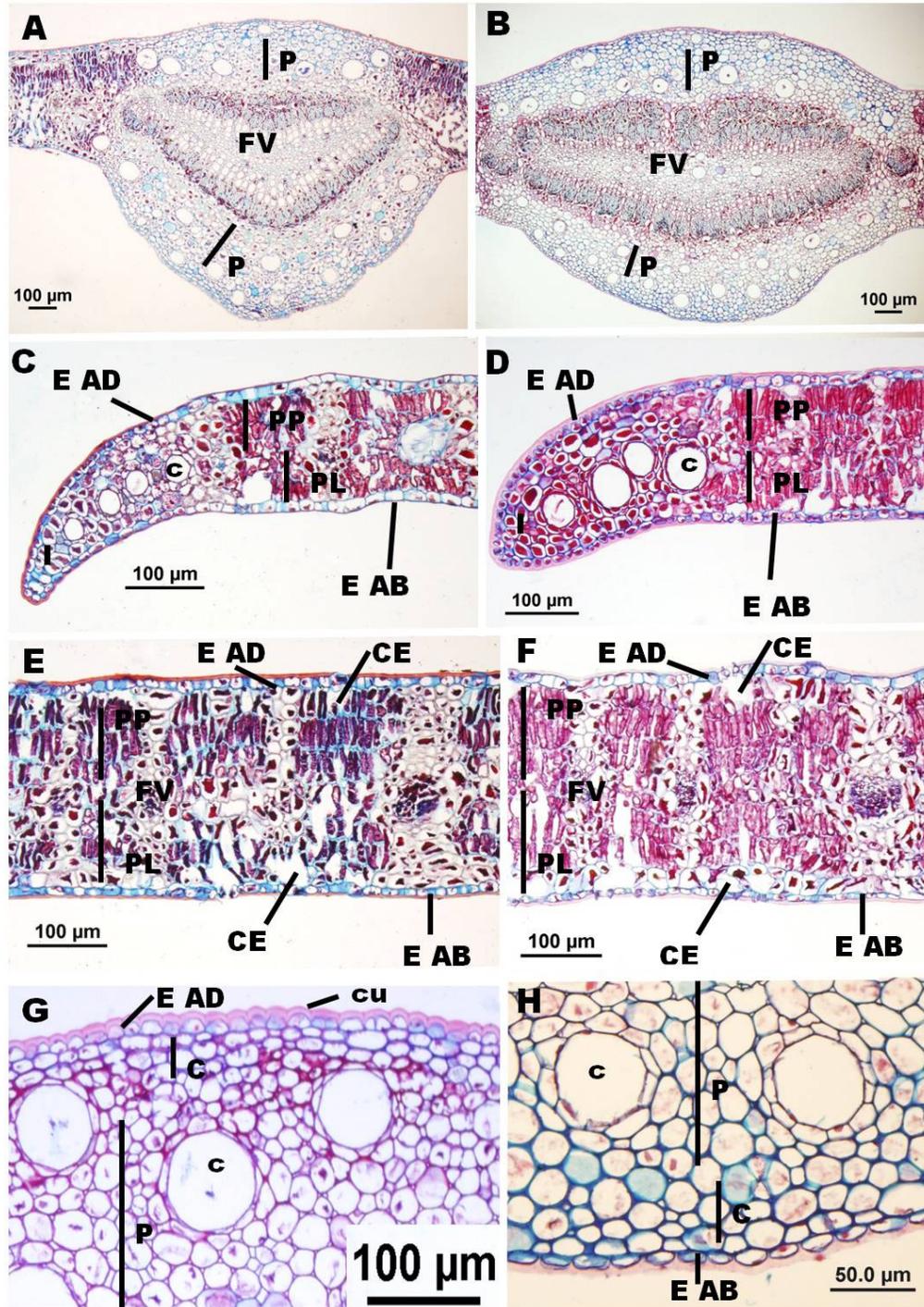


Figura 3: Comparação entre secções transversais de *K. coriacea* subsp. *coriacea* (A, C, E e G) e *K. grandiflora* (B, D, F e H). A, B, G e H. Região da nervura central. C, D, E e F. Região marginal. A e B. Evidenciando a organização dos feixes vasculares na região da nervura central. C e D. Extremidade da região marginal. E e F. Secção do limbo foliar. G e H. Detalhe evidenciando o formato das células epidérmicas, a cutícula espessa e a ocorrência de colênquima próximo à epiderme. (FV – feixe vascular, C – colênquima, P – parênquima, E AD – epiderme adaxial, E AB – epiderme abaxial, PP – parênquima paliçádico, PL – parênquima lacunoso, CE – cavidade estomática, c – canal/cavidade secretor(a), cu – cutícula)

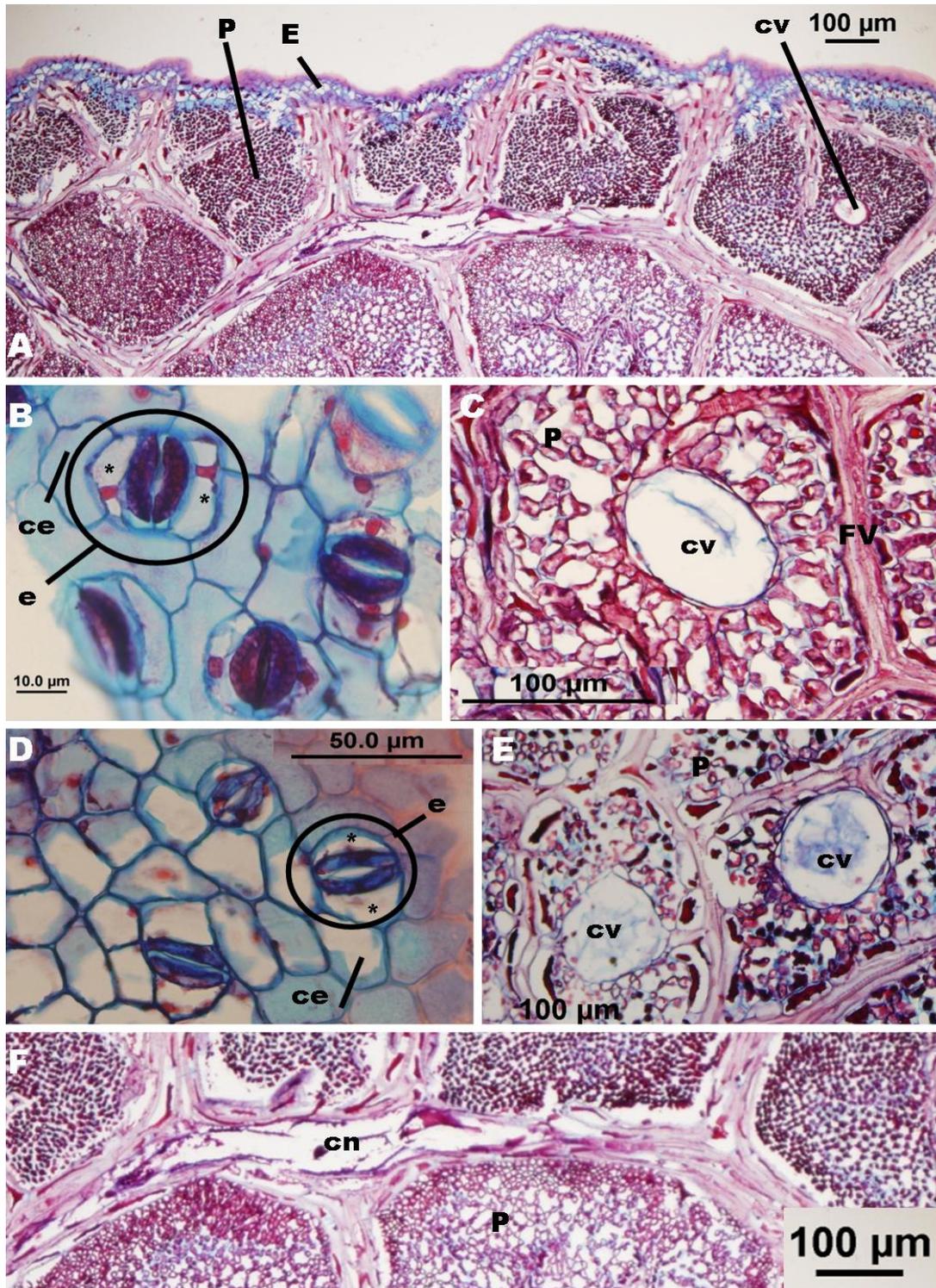


Figura 4: Secções paradermicas de *K. coriacea* subsp. *coriacea* (D e E) e de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (A, B, C e F). A – Seção evidenciando a epiderme, o parênquima e uma cavidade. B e D – Detalhe do estômato. C e E – Detalhe de cavidades secretoras. F – Detalhe de um canal secretor. (E – epiderme, FV – feixe vascular, P – parênquima clorofiliano, cv – cavidade secretora, e – estômato, ce – célula epidérmica comum, \* célula subsidiária, cn – canal secretor)

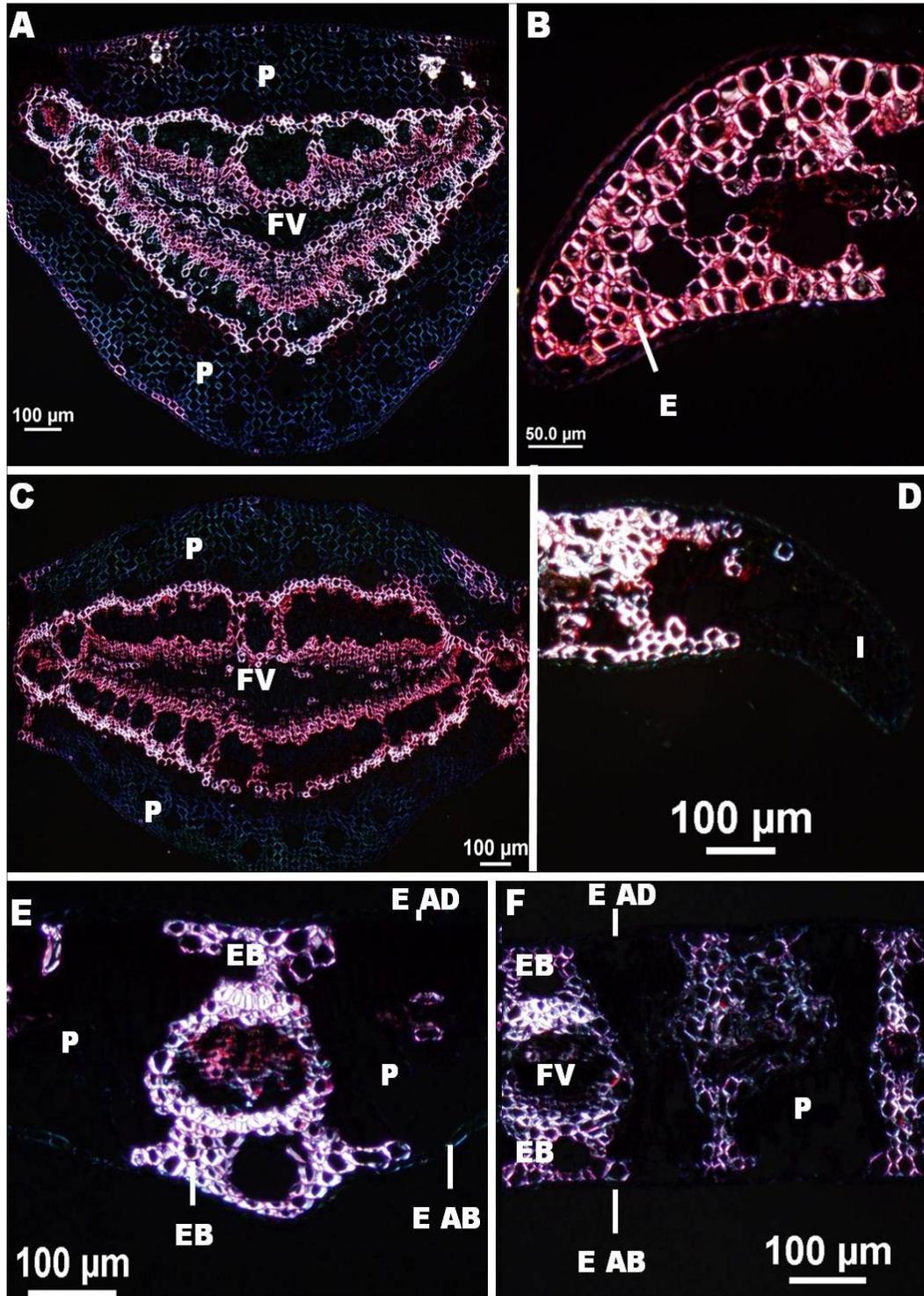


Figura 5: Secções transversais sob luz polarizada pertencentes a *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (A, B e E) e a *K. coriacea* subsp. *coriacea* (C, D e F). A e C – Região da nervura central. B e D – Extremidade da região marginal, evidenciando a presença de células com a parede espessada em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. E e F – Feixes vasculares secundários com extensão da bainha formada por células com parede espessada. (FV – feixe vascular, P – parênquima, E – esclerênquima, E AD – epiderme adaxial, E AB – epiderme abaxial, EB – extensão de bainha)

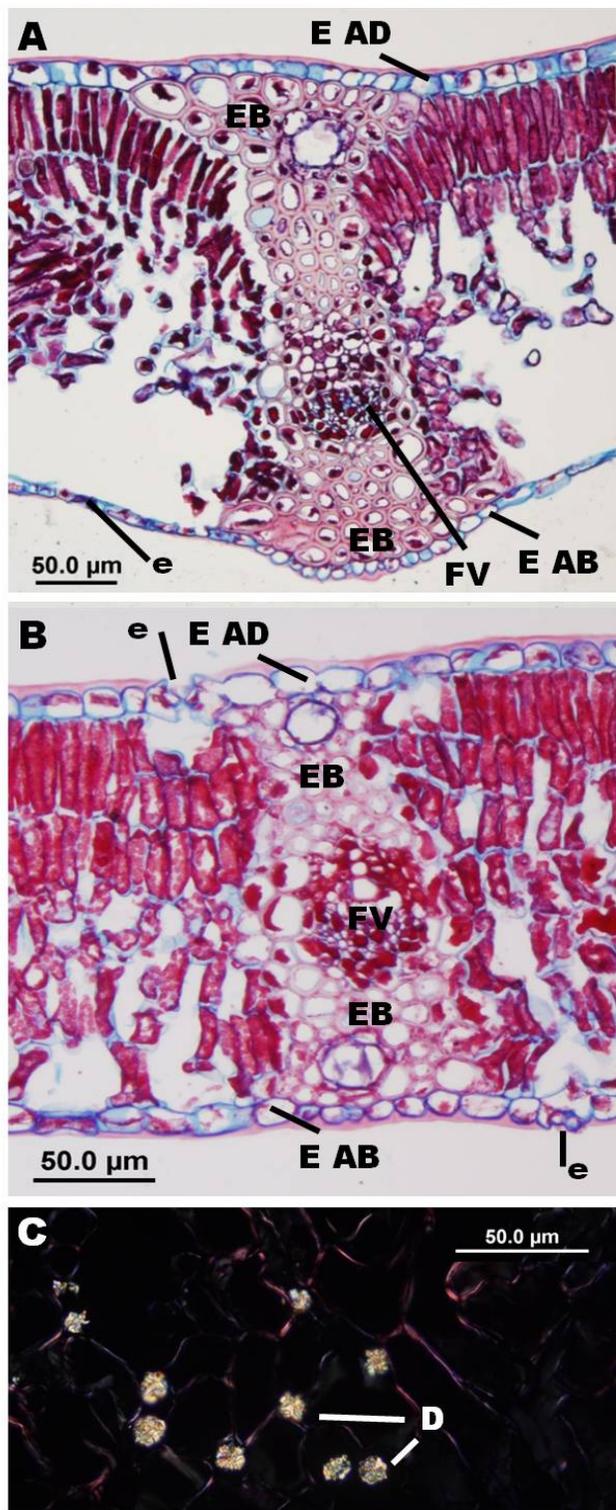


Figura 6: A e B – Detalhes de feixes vasculares secundários em secção transversal, evidenciando a extensão de bainha (A – *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. B – *K. coriacea* subsp. *coriacea*). C – Secção paredérmica de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* evidenciando drusas. (FV – feixe vascular, E AD – epiderme adaxial, E AB – epiderme abaxial, EB – extensão de bainha, e – estômato, D - drusa)

## DISCUSSÃO

As observações apresentadas por Metcalfe & Chalk (1950) para a família Clusiaceae (na época *Kielmeyera* pertencia a esta família) foram muito semelhantes ao que foi encontrado no trabalho atual e nos estudos realizados por Caddah (2009). Para as Clusiaceae os autores relataram a ocorrência de células secretoras com frequência em tecidos parenquimatosos, o que também pode ser observado *Kielmeyera*.

No complexo "*K. coriacea*" há idioblastos fenólicos em toda a extremidade da margem e junto aos feixes vasculares na nervura central e no limbo. Merece atenção o fato de as extremidades das regiões marginais tanto de *K. grandiflora*, quanto de *K. coriacea* subsp. *coriacea* serem repletos de idioblastos fenólicos, conforme observado por Caddah (2009).

Os tricomas raramente presentes em Clusiaceae, quando ocorreram, foram classificados como simples unicelulares ou unisseriados e raramente foram encontrados tricomas dicotomicamente ramificados. Nos táxons estudados os tricomas só ocorreram em *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e foram do tipo simples e pluricelulares.

Stevens (1974) utilizou a anatomia da região da nervura central associada a caracteres morfológicos como forma, tamanho, rigidez, proeminência da margem e cor da folha quando seca, para delimitar as espécies de *Calophyllum*. No caso do complexo *Kielmeyera coriacea*, a região da nervura central não diferiu muito entre as espécies e subespécies.

A diferença mais marcante quanto à nervura central foi a forma: pentagonal em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, triangular em *K. coriacea* subsp. *coriacea* e elipsoide em *K. grandiflora*, o que está de acordo com os dados morfológicos relacionados ao grau de saliência da nervura central (em *K. grandiflora* ela é achatada e nas subespécies de *K. coriacea* é proeminente).

Além da forma da nervura central, há uma camada de esclerênquima, interna à epiderme, presente somente em *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e ausente nos outros dois táxons.

Conforme Metclafe e Chalk (1950) as variações de tamanho e espessura das células epidérmicas e cutícula têm utilidade taxonômica somente no nível de espécies. Neste trabalho não foi possível medir as células epidérmicas e quanto à forma estas não apresentaram diferenças entre as espécies e subespécies estudadas.

Para a cutícula, Caddah (2009) observou diferenças na ornamentação entre *K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *coriacea*, sugerindo que sejam realizados estudos com microscopia eletrônica de varredura a fim de verificar a existência de um terceiro tipo de ornamentação em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

O limbo e a extremidade da margem apresentaram diferenças características e que permitiram a fácil identificação dos indivíduos. No limbo, o mesofilo é dorsiventral em todos os exemplares estudados, assim como relatado para a maioria das espécies de Clusiaceae. No complexo *K. coriacea* não foram encontrados tecidos em paliçada na região da nervura central; Stevens (1974) observou situação semelhante em *Calophyllum*, gênero pertencente à mesma família que *Kielmeyera* sensu APG III (2009).

O parênquima paliçádico apresentou organização semelhante à descrita e não foi muito diferente entre as espécies estudadas (com uma a três camadas de células sobre um tecido lacunoso que ocupa mais de metade do mesofilo). Porém tanto em *K. coriacea* subsp. *coriacea* quanto em *K. grandiflora* as células do parênquima lacunoso são alongadas e apresentam organização compacta, com poucos espaços intercelulares, enquanto em *K. coriacea* subsp. *tomentosa* estas células têm forma irregular e amplos espaços intercelulares, sendo este um caráter extremamente útil para a identificação das subespécies estudadas.

No limbo tanto de *K. coriacea* subsp. *coriacea* quanto de *K. grandiflora* os estômatos estão dispostos em ambas as faces foliares, enquanto em *K. coriacea* subsp. *tomentosa* os estômatos estão restritos a face abaxial. Interessantemente a ocorrência de estômatos restrita à face abaxial havia sido relatada em *Calophyllum*. Neste trabalho, a distribuição diferencial dos estômatos revelou-se um caráter valioso na distinção das subespécies de *K. coriacea*.

Os feixes vasculares do limbo encontram-se sempre acompanhados por uma extensão de bainha de esclerênquima, conforme já havia sido observado em estudos anteriores por Metcalfe e Chalk (1950) e Caddah (2009).

Caddah e colaboradores (2012) ao comparar a anatomia do limbo e do pecíolo foliares das espécies *K. coriacea* e *K. grandiflora* obtiveram em seus resultados algumas semelhanças e diferenças que permitiram a distinção das duas espécies.

Entre as semelhanças estão:

- tipo de estômato (no trabalho atual foi paracítico para todos os espécimes estudados),
- feixes vasculares envoltos por bainha de células parenquimáticas com compostos fenólicos,

- canais secretores orientados paralelamente e próximos aos feixes vasculares (a mesma situação foi observada neste trabalho);
- idioblastos cristalóides,
- presença de coléteres nas gemas caulinares,
- sistema vascular composto por três feixes, sendo um central maior e dois laterais menores,
- duas ou três camadas de parênquima paliçádico e parênquima lacunoso com células alongadas, bainha dos feixes atingindo as duas faces foliares.

As diferenças encontradas foram:

- forma diferenciada do feixe vascular no pecíolo,
- células do mesofilo de *K. coriacea* apresentaram coloração intensa na presença de sulfato ferroso em formalina devido a maior concentração de compostos fenólicos,
- cavidades presentes somente quando *K. coriacea* e *K. grandiflora* foram encontradas simpatricamente,
- nervura central mais achatada em *K. grandiflora*,
- medula sem canais secretores em *K. coriacea*.

Comparando os estudos é possível perceber inúmeros resultados corroborados como: diferença na forma do pecíolo e da nervura central (no caso, foi observada diferença na forma da região da nervura central), estrutura do mesofilo, a localização de canais secretores próximos aos feixes vasculares e o tipo de estômato. Mas o trabalho atual permitiu acrescentar mais alguns caracteres anatômicos a serem analisados para o complexo: presença de esclerênquima interno à epiderme na nervura central, forma dos espaços intercelulares e das células do parênquima lacunoso e distribuição dos estômatos.

Além das regiões previamente estudadas por Caddah e colaboradores (2012), foi analisada a extremidade marginal, a qual mostrou-se bastante informativa.

Na extremidade marginal os três táxons diferiram quanto à forma: afilada em *K. coriacea* subsp. *coriacea*, arredondada em *K. grandiflora* e alargada com uma junção abrupta entre as faces em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*. A composição celular desta região também se mostrou distinta: idioblastos fenólicos para *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. grandiflora* e, predominantemente, células esclerenquimáticas em *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

No presente estudo, notou-se que embora exista um grande número de caracteres anatômicos de extrema utilidade na taxonomia do complexo e estes sejam

quase sempre constantes, pode haver variação entre espécimes, o que foi observado também em *Calophyllum* por Stevens (1974). Desde a realização do estudo de Caddah (2009), sabe-se que ao menos entre *K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *coriacea* a situação intermediária de caracteres existe e deve ser esperada uma vez que dados moleculares indicaram a hibridação entre as espécies, o que também foi encontrado neste estudo (ver Capítulo 3 para mais detalhes).

Para o complexo *K. coriacea* a anatomia estrutural forneceu resultados de extrema utilidade para o questionamento da proposta para a taxonomia da espécie *K. coriacea* apresentada por Saddi (1982). Caddah (2009) havia relatado dúvidas a respeito de numerosas identificações e iniciou os estudos anatômicos no complexo comparando pecíolo e região mediana do limbo foliar das espécies *K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *coriacea*. Os resultados de Caddah e colaboradores (2012) apontaram para uma grande semelhança entre as espécies, mas indicaram caracteres capazes de distingui-las.

O estudo atual complementou os dados anatômicos para o complexo *K. coriacea* ao ter incluído nas análises indivíduos de *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e realizado secções de regiões marginais do limbo, além da região mediana. A proposta apresentada a respeito das subespécies apresentada no capítulo 1 (*K. coriacea* subsp. *tomentosa* deve ser elevada à categoria de espécie e considerada um táxon distinto de *K. coriacea* subsp. *coriacea*) foi corroborada pelos resultados obtidos.

Uma vez que a estrutura anatômica é conhecida por ser bem conservada entre as espécies, os dados sugeriram: grande proximidade entre *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. grandiflora*, semelhantemente aos obtidos por Caddah e colaboradores (2012) e diferenças que devem ser consideradas na classificação de *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, indicando a necessidade de alteração da classificação taxonômica do complexo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.V., ESTELITA, M.E.M., WANDERLEY, M.G.L. & THOMAS, W.W. 2002. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar das espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). Revista Brasileira de Botânica. 25 (1): 1-9.

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161: 105-121.
- BICUDO, L.R.H, CESAR, O. & MONTEIRO, R.1996. Florística comparativa de uma área de cerrado no município de Botucatu, SP (Brasil). *Braz Arch Biol Technol*. 39: 685–691.
- BIERAS, A.C. & SAJO, M.G. 2004. Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasiliis*. 18(3): 601-612.
- BIERAS, A.C. & SAJO, M.G. 2009. Leaf structure of the cerrado (Brazilian savanna) woody plants. *Trees*. 23:451-471.
- CADDAH, M.K. 2009. Estudos taxonômicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Unpublished MSc Thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- CADDAH, M.K., MAYER, J.L.S., AMARAL, M.C.E. & BITTRICH, V. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae) – a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 168: 101-115.
- CASTRO, A.A.J.F. & MATINS, F.R. 1999. Cerrados do Brasil e do nordeste: caracterização, área de ocupação e considerações sobre a sua fitodiversidade. *Pesqui Foco* 7:147–178.
- CASTRO, A.A.J.F., MARTINS, F.R., TAMASHIRO, J.Y. & SHEPHERD, G.J. 1999. How rich is the flora of brazilian cerrados? *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 86: 192-224.
- CLARK, G. 1973. Staining procedures. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- D'ARCY, W.G. & KEATING, R.C. 1979. Anatomical Support for the Taxonomy of *Calophyllum* (Guttiferae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 66: (3): 557-571.
- DURIGAN, G., LEITÃO FILHO, H.F. & RODRIGUES, R.R. 1994. Phytosociology and structure of a frequently burnt cerrado vegetation in SE- Brazil. *Flora* 189: 153-160.
- FERRI, M.G. 1944. Transpiração de plantas permanentes dos cerrados. *Bol. FFCL USP*. 41 (4): 159-224.
- FIGUEIREDO, R.C.L., HANDRO, W. & CAVALCANTE, P.B. 1971. Contribuição ao estudo da nervação foliar das plantas dos Cerrados - Connaraceae, Ebenaceae e Guttiferae. In: III Simpósio sobre o Cerrado, 1971, São Paulo. III Simpósio sobre o Cerrado. São Paulo : EDUSP – Editora da Universidade de São Paulo. 1: 231-239.
- GERLACH, G. 1969. Botanische mikrotechnik, eine lifuhrung. Georg Thieme. Stuttgart.

- GOMES, S.M., SOMAVILLA, N.S.D.N, COMES-BEZERRA, K.M., MIRANDA, S.C., DE-CARVALHO, P.S. & GRACIANO-RIBEIRO, D. 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Botanica Brasiliensis*. 23(1): 223-238.
- JOHANSEN, D.A. 1940. *Plant Microtechnique*. MacMillan & Co., London
- SCHOFIELD, E. K. 1968. Petiole anatomy of the Guttiferae and related families. *Mem. New York Bot. Gard.* 18: 1-55.
- JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLONGG, E.A., STEENS P.F. & DONOGUE, M.J. 2009. *Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed.612p.
- LEITÃO FILHO, H.F. 1992. A flora arbórea dos cerrados do estado de São Paulo. *Hoehnea*. 19:151–163.
- MEINZER, F.C., GOLDSTEIN, G., FRANCO, A.C., BUSTAMANTE, M, IGLER, E., JACKSON, P., CALDAS, L. & RUNDEL, P.W. 1999. Atmospheric and hydraulic limitations on transpiration in Brazilian cerrado woody species. *Functional Ecology*.13: 273-282.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1950. *Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy*. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1979. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. 2.ed. Clarendon Press, Oxford.
- METCALFE, C.R. & CHALK, L. 1983. *Anatomy of the dicotyledons, wood structure and conclusion of the general introduction*. Clarendon Press, Oxford, UK. 297pp.
- MORRETES, B.L. & FERRI, M.G. 1959. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado. *Bol Bot USP* 16:7–70.
- MORRETES, B.L. 1967. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado II. *Bol Bot USP*. 22: 209–244.
- MORRETES, B.L. 1969. Contribuição ao estudo da anatomia das folhas de plantas do cerrado III. *Bol Bot USP* 24:7–32.
- NOTIS, C .2004. *Phylogeny and character evolution of Kielmeyeroideae (Clusiaceae) based on molecular and Morphological Data*. Tese de Mestrado, University of Florida.
- OLIVEIRA, A.F.M, MEIRELLES, S.T. & SALATINO, A. 2003. Epicuticular waxes from caatinga and cerrado species and their efficiency against water loss. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 75(4): 431-439.
- PALHARES, D. & ZAIDAN, L.B.P. 2010. A brief review on leaf anatomy of plants with certain peculiar modes of photosynthesis. *Revista Biociências*. 16 (1): 7-15.

- PEREIRA, Z.V, MEIRA, R.M.S.A., & AZEVEDO, A.A. 2003. Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). *Revista Árvore*. 27 (6):759-767.
- PROENÇA, S.L. & SAJO, M.G. 2007. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasiliis*. 21(3): 657-673.
- RIBEIRO L. F & TABARELLI, M. 2002. A structural gradient in cerrado vegetation of Brazil: changes in woody plant density, species richness, life history and plant composition. *Journal of Tropical Ecology*. 18: 775-794.
- SADDI, N. 1982. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.
- SAJO, M.G. & RUDALL, P.J. 2002. Leaf and stem anatomy of Vochysiaceae in relation to subfamilial and suprafamilial systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 138: 339-364.
- SCHOFIELD, E.K. 1968. Petiole anatomy of the Guttiferae and related families. *Memories of The New York Botanical Garden*. 18: 1-55.
- SCOTLAND, R.W., OLMSTAND, R.G. & BENNET, J.R.. 2003. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. *Systematic Biology*. 52: 539-548.
- SILVA, R.J.S & POTIGUARA, R.C.V. 2008. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies amazônicas de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae). *Acta Botanica Brasiliis*. 22 (4): 999-1014.
- SOLEREDER, H. 1908. *Systematic anatomy of dicotyledons*. Oxford. Clarendon.
- STEVENS, P. F. 1974. A review of *Calophyllum* L. (Guttiferae) in Papuasias. *Austral. Journal of Botany*. 22: 349-411.
- STEVENS, P.F. 1976. The Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). 1. The Mascarene Islands. *Journal of the Arnold Arboretum*. 57: 167-184.
- STEVENS, P.F. 1980. A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61: 117-690.
- TANNUS, J.L.S. & ASSIS, M.A.A. 2004. Composição de espécies vasculares de campo sujo e campo úmido em área de cerrado, Itirapina – SP, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 27: 489 - 509.
- VESQUE, J. 1889. *Epharmonsia sive materiae ad instruendam anatomiam pars secunda*. Paris.
- VESQUE, J. 1893. Guttiferae. In A. & C. de Candolle, *Monographiae Phanerogamarum*. Vol. 8. Paris.

## **CAPÍTULO 3**

**Diversidade e estrutura genética em populações de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. utilizando marcadores microssatélites**

## INTRODUÇÃO

A delimitação de espécies pode ser problemática, principalmente em casos de táxons de divergência recente, que podem formar um contínuo com extremos correspondendo à espécie e situações intermediárias a híbridos em resposta a variações ambientais. (Cavallari *et al.* 2010)

A maior parte das espécies nomeadas tem sido delimitada com base em caracteres morfológicos. A definição morfológica das espécies, entretanto pode ter conexões limitadas com a genética ou a evolução. Alguns grupos de indivíduos parecem inicialmente indistinguíveis morfológicamente, mas são compostos por duas ou mais espécies distintas (espécies crípticas).

Dificultando, não existe uma definição universalmente aceita de espécie, nem que se aplique a todas as situações. O conceito biológico de espécie tem sido a definição mais aceita na genética populacional e evolutiva e na biologia da conservação. Essa define uma espécie como um grupo de indivíduos e populações naturais que na prática, ou potencialmente, se inter cruzam e que não cruzam com indivíduos de outros grupos. Essa definição reconhece que indivíduos dentro de uma espécie podem trocar material genético, enquanto diferentes espécies não o fazem (Frankhan, Ballou & Briscoe 2008) e geralmente não é aceita na botânica uma vez que é reconhecida a elevada frequência de hibridização em plantas superiores (Whittemore 1993).

Grupos de indivíduos compartilhando a mesma área estarão trocando material genético se pertencerem à mesma espécie. E populações da mesma espécie separadas geograficamente serão capazes de cruzar e produzir descendentes férteis na primeira geração e nas gerações subseqüentes.

As populações da maioria das espécies apresentam algum nível de estruturação genética que pode ser devida a variados agentes como barreiras ecológicas, processos históricos e sistema reprodutivo (Donnelly & Townson 2000, Gerlach & Musolf 2000, Palsson 2000, Tiedemann *et al.* 2000, Balloux & Lugon-Moulin 2002).

É sabido que quase todos os organismos apresentam um padrão de distribuição resultante da descontinuidade do habitat e/ou do comportamento (forrageio, sistema reprodutivo, etc.) (Pickett & White 1985, Krebs & Davies 1997).

Nesse sentido, a ecologia tem fundamental importância no processo de especiação (Orr & Smith 1998, Schluter 2001, Wiens 2004, Gegear & Burns 2007). Espécies incipientes podem ocorrer em locais com diferentes características e, assim, a

adaptação local pode resultar em divergências evolutivas (Wiens 2004), culminando no isolamento reprodutivo (isto é, em espécies distintas). Porém em alguns casos o isolamento reprodutivo entre táxons de divergência recente pode ser incompleto, tornando obscuros os limites entre as espécies (Rieseberg & Willis 2007, Cavallari *et al.* 2010).

A distribuição espacial de espécies, influenciada ecologicamente, pode apresentar também uma estrutura espacial na frequência de alelos, causada por padrões de fluxo gênico, seleção diferencial entre áreas, deriva genética e sistema reprodutivo (Wright 1931, 1943). Mesmo espécies com distribuição espacial contínua, a endogamia é restrita a pequenas distâncias pelo alcance dos meios de dispersão e polinização. Nesse caso, as populações podem se diferenciar por um processo denominado isolamento por distância (Wright 1943). Assim a diferenciação genética entre populações deve resultar de restrição no fluxo gênico e, conseqüentemente, estar correlacionada com distâncias geográficas.

O uso de técnicas moleculares, incluindo abordagens genômicas, permitiu examinar a genética de uma espécie, incluindo as que se encontram em risco de extinção, e este tipo de análise tem se tornado amplamente utilizada no campo da conservação (Oliveira *et al.* 2006).

Desde o desenvolvimento da biologia da conservação como um campo de estudo independente, cientistas têm focado seus trabalhos nas conseqüências genéticas da existência e manutenção de populações com tamanho pequeno (Soulé 1980, Schonewald-Cox *et al.* 1983). Apesar de diminuições massivas na abundância das espécies tenham, em sua maior parte, sido causadas por ações antropológicas e fatores ecológicos, a persistência das populações a longo prazo irá depender da manutenção da diversidade genética das espécies (Bouzat 2010). A fragmentação de habitats pode ser considerada uma das principais causas de perda de populações e de espécies (Eriksson & Ehrlen 2001).

Fragmentações de habitats têm mudado a paisagem, tornando o ambiente um mosaico de áreas remanescentes (Laurance & Bierregaard 1997). Nesse processo, populações grandes são reduzidas e subdivididas, possivelmente ficando isoladas umas das outras. A autoecologia da espécie é, geralmente, alterada e vários processos genéticos são afetados quando as populações são drasticamente reduzidas e o ambiente é fragmentado (Hartl & Clark 1988; Hanski & Simberloff 1997).

O isolamento de populações fragmentadas pode resultar em diferenciação genética, endogamia e aumento do efeito da deriva genética (Templeton *et al.* 2001). Esses efeitos diferem conforme o grau de fragmentação e a biologia das espécies (Young & Boyle 2000). O fluxo gênico pode ficar restrito se as distâncias entre as populações forem muito grandes, mas também pode ser favorecido em algumas circunstâncias com a criação de áreas mais abertas no ambiente (Robledo-Arnuncio *et al.* 2004).

A diversidade genética é muito importante para adaptação e sobrevivência de populações naturais a ambientes diferentes. Contrariamente, uma diversidade genética limitada pode impedir a adaptação a longo prazo e a perda da diversidade pode, imediatamente, resultar em redução do “fitness” populacional devido à depressão endogâmica (Frankel & Soulé 1981, Lande 1988, Reed & Frankham 2003, Reed *et al.* 2003, Frankham 2005, Väli *et al.* 2008).

Deste modo, o conhecimento sobre como a diversidade genética está estruturada em contexto espacial, tanto entre quanto dentro de populações, tem contribuído muito à compreensão da história evolutiva e da dinâmica populacionais. Para espécies endêmicas, a identificação precisa de populações ou “porções” da distribuição da espécie que contenham grande diversidade alélica é crucial no desenvolvimento de políticas de conservação (Hamrick *et al.* 1991, Frankham *et al.* 2002, Cole 2003, Leimu *et al.* 2006, Willi *et al.* 2006). É possível, ainda, a detecção de espécies com pouca divergência evolutiva (Drummond & Hamilton 2007).

A estrutura genética de populações compreende a diversidade genética, variações populacionais, fluxo gênico, etc. A diversidade genética de uma espécie é somatória da informação genética em um pool gênico. Estratégias efetivas de conservação devem basear-se em estudos de diversidade genética em variados níveis (Millar & Westfall 1992). Estes estudos envolviam a busca de evidências morfológicas, citológicas e bioquímicas antes do uso de marcadores moleculares.

Estimar o fluxo gênico através de marcadores moleculares envolve determinar a distribuição de alelos no espaço. Ao estudar populações distantes geograficamente é possível encontrar um grupo de alelos em uma ou outra população, mas ausente em uma população distante, indicando a completa diferenciação.

A taxa de fluxo gênico é inferida a partir da diferenciação entre populações; essa abordagem baseia-se em um modelo demográfico (descreve a forma como ocorre a dispersão), um sistema de marcador genético (estabelece o padrão de diferenciação genética das populações), um modelo genético populacional e na estimativa de

parâmetros (distância genética, frequência de alelos privados, métodos de autocorrelação espacial, etc.).

### Estudos populacionais em plantas

Em plantas a variação fenotípica pode não ser classificada em categorias discretas e associada à ocorrência de hibridização interespecífica constitui um grande obstáculo ao estudo de especiação por botânicos (Rieseberg & Willis 2007). Apesar de diferenças morfológicas e de preferências de habitats, uma graduação de formas intermediárias pode ser encontrada, tornando difícil a delimitação dos táxons (Cavallari *et al.* 2010). Devido à falta de estudos da estrutura genética das espécies, questões envolvendo dois táxons que podem tanto representar um contínuo genético de uma única espécie em resposta a variações ambientais ou constituir duas unidades biológicas independentes continuam sem solução.

Estudos moleculares e genéticos envolvendo plantas sugerem que a autopoliploidia é muito mais comum que o esperado (Soltis *et al.* 2003). Um grande número de famílias de angiospermas, tradicionalmente consideradas diploides, provavelmente são resultados de eventos de poliploidização antigos (Soltis & Soltis 2000). Esses ancestrais poliploides possuíam cópias extras de alguns genes em quantidade maior que a esperada para diploides (Gottlieb 1982). Genomas e genes duplicados podem assumir diferentes funções após passar por processo evolutivo (Soltis & Soltis 2000, Cui *et al.* 2006), facilitando a colonização de habitats instáveis (Lawton-Rauh 2003).

Conforme Minder & Widmer (2008), espécies padrões devem ser geneticamente distintas entre si, sendo as populações da mesma espécie mais semelhantes entre si mesmo que mais distantes geograficamente que as duas espécies próximas. A ocorrência simpátrica e possíveis espécies e seus intermediários tem sido estudada e no caso de Cavallari e colaboradores (2010) indicou que as formas morfológicamente intermediárias seriam o resultado de hibridização ao invés de resultantes da adaptação ao ambiente.

Há algum tempo, sugere-se o uso de marcadores moleculares para testar a delimitação de espécies (Sites & Marshall 2003, 2004) e unidades evolutivas significativas dentro das espécies. Porém tradicionalmente, estes marcadores não apresentam poder e exatidão estatísticas suficientes para estimar com confiança

diferenças genéticas. A descoberta de locos amplamente variáveis como os microssatélites (SSRs) representou uma grande mudança, ao permitir que fosse alcançado o poder estatístico necessário para realização de determinadas análises (Hedrick 2001, Oliveira *et al.* 2006).

Os SSRs têm provado ser poderosos na solução de problemas biológicos e são muito utilizados para compreensão da história de populações naturais (Chambers & MacAvoy 2000), permitindo melhor entendimento dos limites entre espécies e de hibridização interespecífica (Lexer *et al.* 2005, Drummond & Hamilton 2007), o que é particularmente importante no caso de plantas.

### Histórico dos marcadores moleculares

Os primeiros marcadores genéticos utilizados foram caracteres morfológicos, cujos genes responsáveis apresentavam segregação Mendeliana. Eram, em geral, fenótipos de fácil identificação visual como nanismo, cor de pétala ou morfologia foliar. No entanto, esses marcadores existem em número limitado e sua avaliação pode ser demorada, pois eles dependem do desenvolvimento da planta (Borém 1998).

Em 1966 realizaram o primeiro estudo da variação alélica em locos que codificam para proteínas solúveis. A técnica usada para distinguir as variantes é a eletroforese, a qual separa as moléculas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular em um gradiente de potencial elétrico. Entretanto, cerca de 30% das mudanças no DNA resultam em mudanças nas cargas das proteínas, de maneira que essa técnica subestima significativamente a medida total da diversidade genética.

Muitos dos métodos mais recentes utilizados para medir a diversidade genética baseiam-se na reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual permite a amplificação no laboratório de sequências específicas do DNA, frequentemente a partir de pequenas amostras iniciais. A PCR é basicamente uma versão em tubo da replicação do DNA, exceto pelo fato de que através dessa técnica replica-se somente uma região de interesse do DNA.

A grande vantagem de medir a diversidade no DNA, ao contrário da variação na proteína, é que a amostragem pode frequentemente ser realizada através de pequena amostra de DNA molde e os genótipos podem ser identificados após a amplificação do DNA. Uma vez que amostras extremamente pequenas de DNA podem ser amplificadas

milhões de vezes pela PCR, somente pequena quantidade de amostra biológica é necessária para a realização das análises genéticas moleculares.

No início dos anos 80 descobriu-se a primeira classe de marcadores de polimorfismo ao nível do DNA, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A técnica consiste no uso de fragmentos de DNA clivados com enzimas de restrição. O polimorfismo é visualizado através da diferença no tamanho dos fragmentos de DNA obtidos após digestão com diferentes enzimas (Garcia *et al.*, 2004).

Outro marcador que foi amplamente utilizado na década de 90 é o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o qual faz uso de *primers* de oligonucleotídeos com sequência arbitrária de bases para a amplificação de DNA genômico. Este marcador apresenta algumas limitações, como a natureza dominante, não permitindo a distinção entre os locos heterozigotos e homozigotos dominantes (Garcia *et al.*, 2004) nem a reprodutibilidade dos dados.

## Microsatélites

### Conceito e histórico

Os marcadores microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat* - Tautz, 1989; Weber & May, 1989) são combinações de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* (Tautz 1993, Ellegren 2000, Schlötterer 2000). Na década de 1980, Hamada e colaboradores documentaram as primeiras repetições de dinucleotídeos. Elas se constituíam em repetições do tipo poli-CA e poli-GT (Powell *et al.* 1996). Posteriormente, descobriram que os SSRs são amplamente distribuídos pelos genomas eucarioto e procarioto (Powell *et al.* 1996, Field & Wills 1998, Tóth *et al.* 2000).

Desde o advento das reações de PCR (Saiki *et al.* 1985) os microsatélites passaram a ser amplamente utilizados. Weber e May (1989) propuseram a amplificação do DNA através de PCR com o uso de dois *primers* compostos por uma sequência curta adjacente aos microsatélites, delimitando o loco. Essa abordagem é utilizada até os dias de hoje para detecção de microsatélites polimórficos (Powell *et al.* 1996) e tem grande importância ao permitir facilmente a reprodução em diferentes laboratórios (Garris *et al.* 2005).

Alelos com muitos pares de base de diferença podem ser diferenciados em géis de agarose, porém é mais frequente o uso de géis de sequenciamento e de

poliacrilamida 6% por assegurarem melhor resolução, permitindo a diferenciação de alelos com uma repetição de diferença (Garris *et al.* 2005).

De maneira geral, os microssatélites não se distribuem maneira uniforme no genoma (Chase *et al.* 1996), encontram-se na fração não codante do DNA e são relativamente raros em regiões codificadoras de proteínas (Arcot *et al.* 1995, Wilder & Hollocher 2001); tal fato está provavelmente relacionada a maior tolerância a mutações da região não codante (Dokholyan *et al.* 2000). Há ainda diferentes frequências conforme o táxon (Chase *et al.* 1996). Os dinucleotídeos são os mais comuns (Wang *et al.* 1994, Schug *et al.* 1998, Li *et al.* 2002).

Os microssatélites podem ser classificados quanto ao motivo (di a hexanucleotídeos) e ao tipo de repetição em perfeitos (sequência não interrompida por nenhuma base diferente, por ex.: ACACACACAC), imperfeitos (quando há um par de bases entre os motivos, por ex.: ACACGACACAC), interrompidos (quando há uma pequena sequência dentro do motivo, por ex.: ACACACTGTAACAC) ou compostos (quando há dois motivos repetidos em sequência, por ex.: ACACACTATATATA) (Oliveira *et al.* 2006).

## Características

São marcadores codominantes (permitem a identificação de homozigotos e heterozigotos, assim como a contribuição dos parentais em híbridos), com alto número de alelos (geram uma genotipagem única por indivíduo, possibilitando que se estabeleça o fluxo gênico e a paternidade – Powell *et al.* 1996) e elevado polimorfismo (Ferreira e Grattapaglia 1995).

O grau de polimorfismo deriva das altas taxas de ganhos e perdas de unidades de repetição, as quais ocorrem, principalmente, através de um processo denominado “DNA slippage replication” (em português: escorregamento durante a duplicação do DNA). (Dieringer & Schlötterer 2003). As taxas de mutações também estão diretamente relacionadas com o número de repetições (Wierdl *et al.* 1997). Devido ao alto grau de polimorfismo, os microssatélites tornaram-se os marcadores ideais para variados tipos de estudos (ver abaixo).

Os microssatélites medem variação genética para locos neutros (Väli *et al.* 2008) (não sujeitos à seleção) uma vez que as repetições em *tandem* geralmente estão localizadas em segmentos não codantes do DNA (Arcot *et al.* 1995, Wilder & Hollocher

2001). Por geralmente serem considerados marcadores neutros, eles permitem uma estimativa não viesada da diversidade genética (Väli *et al.* 2008).

A técnica baseia-se na amplificação das sequências repetidas, utilizando-se oligonucleotídeos ancorados nas regiões flangeadoras às repetições. Os marcadores SSR revelam polimorfismos individuais, devido à variação no número de repetições de um determinado loco de microssatélites (Tautz & Renz 1984).

São altamente informativos e uma forma eficiente e precisa de detecção da variação genética em qualquer organismo, cujo DNA possa ser extraído (Powell *et al.* 1996). Podem ser obtidos a partir de qualquer tipo de tecido, em qualquer estágio de desenvolvimento e é necessária uma pequena quantidade de DNA (Powell *et al.* 1996). Assim os microssatélites configuram-se como marcadores ideais para mapeamento genético de genomas, para identificação e discriminação de genótipos, estudos de genética de populações (Schlotterer 2000, Zucchi *et al.* 2002, Pinto *et al.* 2003 a e b), testes de paternidade (Barreneche *et al.* 1998), elaboração de mapas de ligação (Beckmann & Soller 1990; Morgante & Olivieri 1993), caracterização de indivíduos em populações naturais (Chase *et al.* 1996), monitoramento da transmissão gênica ao longo de gerações (Chase *et al.* 1996) ou mesmo para seleção assistida em programas de melhoramento genético.

Suas características, ao permitirem a distinção entre indivíduos proximalmente aparentados, são muito importantes, pois são capazes de detectar híbridos (Powell *et al.* 1996). Após o primeiro uso em populações naturais, na década de 1990 (Ellegren 1991, 1992, Schlotterer *et al.* 1991), os microssatélites têm sido o marcador escolhido para estudos que envolvem genética populacional e ecologia molecular (Väli *et al.* 2008)

Além das propriedades mencionadas, custo não muito elevado, transferabilidade (os microssatélites de uma espécie com frequência podem ser amplificados e utilizados em espécies próximas) (Schlotterer *et al.* 1991, Kijas *et al.* 1995, Levine *et al.* 1995, Dayanandan *et al.* 1997, Väli *et al.* 2008), desenvolvimento e análises relativamente fáceis, os tornam extremamente importantes em estudos de organismos que não sejam modelos. Deve-se atentar para estudos que relatam a tendência de maior polimorfismo dos microssatélites na população a partir da qual foram isolados (Ellegren *et al.* 1995, 1997).

Apesar de apresentar estas numerosas características, quando espécies de divergência recente hibridizam em simpatria, pode ser gerado um padrão genético interessante (Mallet 2005). Enquanto espera-se que marcadores neutros (como os

microssatélites) estejam sujeitos à seleção divergente de modo que apresentem locos fortemente diferenciados entre espécies, alguns segmentos permanecem semelhantes devido à introgressão e à recombinação frequente (Mallet 2005).

Como relatado para *Helianthus* por Kane e colaboradores (2009), a introgressão pode ocorrer entre populações localizadas próximas geograficamente, mesmo entre espécies consideradas distantes. Quando analisadas com marcadores moleculares, as populações de espécies distantes, em simpatria e hibridizando, aparecem mais semelhantes do que populações de espécies próximas, mas alopátricas (Kane et al 2009). Tornando a situação mais complexa a introgressão pode ser extremamente seletiva, afetando somente algumas partes do genoma (Mallet 2005).

Caddah (2009) iniciou os estudos genéticos para o complexo *K. coriacea* ao analisar quatro populações do estado de São Paulo. Porém a autora não incluiu *K. coriacea* subsp. *tomentosa* de forma que é necessária a realização de estudos incluindo este táxon uma vez que é um dos questionamentos taxonômicos com relação à última classificação proposta (Saddi 1982). Além disto, é de grande interesse testar se a situação encontrada em São Paulo (formação de híbridos entre *K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *coriacea*) ocorre no restante das áreas de distribuição das espécies pertencentes ao complexo.

Desta forma, este trabalho teve como objetivos:

- estudar a estrutura genética de populações de *K. coriacea* subsp. *coriacea*, *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*, quando possível comparando situações de simpatria e alopatria,
- verificar se há fluxo gênico e formação de híbridos entre as subespécies de *K. coriacea* e destas com *K. grandiflora*,
- complementar os estudos de Caddah (2009) aumentando a área geográfica amostrada e incluindo *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

As análises de estudos populacionais, como o atual, geralmente se baseiam nas estatísticas  $F_{ST}$  de Wright (1951) e/ou nas estatísticas análogas de Slatkin (1995). Os valores de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  são importantes indicadores a respeito do grau de estruturação das populações e podem ser interpretados através de uma escala (para escala ver Wright 1978, Hartl & Clark 1997) (Oliveira et al. 2006). A capacidade destes testes de detectar poucas diferenças nas frequências alélicas entre grupos pode gerar resultados que não necessariamente apresentam significado biológico (Balloux & Lugon-Moulin 2002).

## MATERIAL E MÉTODOS

A estrutura das populações foi estudada através da genotipagem de 710 indivíduos das diferentes populações coletadas nos estados: Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Tocantins e no Distrito Federal; as localidades exatas estão representadas na Tabela 1 apresentada no Capítulo 1. Os indivíduos foram coletados de modo que cada um dos táxons (*K. coriacea* susp. *coriacea*, *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*) fosse representado por pelo menos 5 populações, sendo amostradas cerca de 4 populações por estado. A escolha das localidades baseou-se na distribuição do cerrado e, conseqüentemente, do complexo estudado.

Ao todo foram utilizados 12 microssatélites desenvolvidos por Caddah *et al.* (2009). Inicialmente seriam utilizados os mesmos do trabalho de Caddah (2009), porém três deles não apresentaram boa amplificação em um número considerável de indivíduos, assim foi necessário escolher alguns marcadores não caracterizados, mas desenhados por Caddah (Tabela 1).

Tabela 1: Marcadores utilizados e suas características (em azul estão os marcadores inéditos).

Identificação do <i>primer</i>	Loco (Caddah <i>et al.</i> 2009)	Motivo repetido	Temperatura de anelamento
1	Kco 10	(CT) <sub>11</sub> (CA) <sub>8</sub>	53,9
2	Kco 02	(AG) <sub>25</sub>	45,4
3	Kco 09	(AG) <sub>6</sub> (TG) <sub>7</sub>	45,4
4	Kco 11	(ATCTA) <sub>6</sub>	51,4
5	Kco 03	(TC) <sub>10</sub>	58,8
6	Kco 08	(GT) <sub>7</sub>	49,2
7	Kco 06	(GA) <sub>18</sub>	60,0
8	Kco 12	não publicado	47,5
9	Kco 13	não publicado	46,3
10	Kco 14	não publicado	57,7
11	Kco 15	não publicado	47,5
12	Kco 16	não publicado	53,9

As possíveis variedades foram coletadas com base em sua distribuição no cerrado brasileiro, visando conseguir realizá-las nas mesmas localidades mencionadas por Saddi (1982) de modo a reduzir as chances de identificação incorreta. Quando não foi possível repetir a coleta devido à degradação ou a coleta foi de um local não mencionado, as subespécies foram identificadas com base em presença/ausência de

tricomas, glaucosidade foliar, grau de saliência das nervuras e organização destas (conforme sugerido por Saddi 1982).

Os indivíduos foram escolhidos aleatoriamente num raio de 3 km (esta distância foi escolhida com base na possível distância alcançada pelo polinizador; uma vez que ele é incapaz de percorrer mais de 3 km, o pólen de um indivíduo por ele polinizado também é, restringindo a esta distância o limite da população) (Oliveira & Sazima 1990) e marcados com uma placa de metal ou com fitilhos colocados em ramos mais finos e elevados numa tentativa de evitar sua retirada (Figura 1). Um código para a população e um para o indivíduo compuseram as identificações. Indivíduos muito próximos foram evitados, uma vez que é conhecido o fato de *Kielmeyera coriacea* s.s. se reproduzir vegetativamente (Bittrich comunicação pessoal), o que acarretaria na presença de numerosos clones nas análises e impediria a interpretação da estrutura genética destas populações.



Figura 1: Indivíduo com a placa de metal utilizada na marcação das populações.

A avaliação do polimorfismo dos microssatélites foi realizada em 27 populações, incluindo ao menos cinco populações de cada uma das espécies/subespécies indicadas *K. coriacea* subsp. *coriacea*, *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*.

O material vegetal utilizado na extração de DNA é constituído por folhas novas dos indivíduos coletados; do total de 710, 44 foram descartados por não apresentarem quantidade de marcadores amplificados a fim de garantir uma boa genotipagem (foram incluídos nas análises indivíduos com até 30% de dados faltantes). Imediatamente após a coleta, o material foi mantido em gelo (conforme Feres *et al.* 2005) durante todo o período de transporte para Laboratório de Análise Genética e Molecular, onde foi liofilizado e armazenado em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a moagem. Posteriormente foi acondicionado em frascos plásticos individualizados, fechados e embalados com parafilme. As amostras ficaram congeladas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização para extração de DNA.

## Extração de DNA e amplificação com microssatélites

Amostras de folhas de cada indivíduo, totalizando 710, moídas foram utilizadas na extração do DNA segundo o protocolo de DNA de Doyle & Doyle (1987) modificado por Caddah (2009) e apresentado no Anexo 2. Após a extração o produto foi quantificado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (Anexo 3 A).

As reações de amplificação foram realizadas com 20 ng de DNA, 14,6µL de água MilliQ, 0,5 U de *Taq*-DNA polimerase, 1,5µM de cloreto de magnésio, 150 µM de dNTP, 0,8 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 20 µM de Tris-HCl e 50 µM de KCl, num volume total de 25,5 µl. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio (Anexo 3 B).

Com a temperatura de anelamento ( $T_a$ ) de cada *primer* conhecida (tabela 1), os termocicladores foram utilizados com as seguintes condições: 1) 94°C 1 min.; 2) 94°C 1 min.; 3)  $T_a$  específica por 1 min.; 4) 72°C por 1 min.; 5) volta ao passo 2 por 30 vezes; 6) 72°C por 5 min.; 7) 15°C, incubação.

Os fragmentos foram visualizados em géis de poliacrilamida 6% corados com prata conforme o protocolo de Creste e colaboradores. (2001), para a avaliação do perfil de polimorfismo dos microssatélites (Anexo 4).

## Análise do Polimorfismo

Os locos de microssatélites isolados foram caracterizados pelo número de “marcas” para cada loco (contadas e com tamanho determinado nos géis de poliacrilamida); estes dados foram transferidos para uma planilha do programa Microsoft Excel. Duas planilhas de dados foram geradas, uma considerando a poliploidia das espécies (nesta cada indivíduo teve até 8 “marcas” por loco e cada uma delas representadas por seu tamanho; quando não havia oito, o restante do espaço foi completado com um valor – no caso -9 – indicativo de ambiguidade na leitura) e outra representando a leitura dos locos de maneira binária (cada “marca” representará um carácter binário: 0 – indicando ausência e 1 – indicando presença). Estudos recentes envolvendo genética de populações de espécies poliploides tem sugerido a primeira abordagem para evitar a perda de dados, uma vez que o marcador deixa de ser lido como dominante.

Estes dados foram analisados com o auxílio dos softwares Ntsys (Rohlf 2000), Fitopac (Shepherd 2008), Popgene (Yeh *et al.* 1999), Newhybrids (Anderson & Thompson

2002), Structure (Hubisz *et al.* 2009), CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007), *distruct* (Rosenberg 2004) e Arlequin (Excoffier & Lischer 2010).

O software FITOPAC (Shepherd 2008) foi utilizado para realizar as análises. análise de agrupamento usando o índice de similaridade de Jaccard e a técnica de ligação da média de grupo (UPGMA) a partir dos dados binários. O dendrograma gerado foi colorido conforme espécies e subespécies (*K. grandiflora*, *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*) e conforme localidade geográfica (estados: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo e Tocantins e o Distrito Federal).

O índice de diversidade de Shannon foi calculado com o uso do software Popgene (Yeh *et al.* 1999). Este índice “mede” o grau de certeza com que se prevê a proximidade genética entre indivíduos; assim quanto menor seu valor, menor a incerteza, logo menor é a diversidade.

Foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) através do software Arlequin (Excoffier & Lischer 2010), sendo testados os seguintes agrupamentos: todas as populações consideradas subpopulações de uma população única, populações divididas conforme a localidade geográfica e populações organizadas conforme as três categorias taxonômicas do complexo senso Saddi (1982) – *K. grandiflora*, *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

O software Structure (Hubisz *et al.* 2009) utiliza o método bayesiano para investigar a estrutura populacional. As configurações utilizadas para estas análises foram: 20 iterações para cada k (número de agrupamentos assumido), com  $1 \leq k \leq 32$ , *burn-in* de 100.000 e 500.000 repetições de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). É usual o valor máximo de K corresponder a  $n+5$ , onde n = número de populações ou grupos amostrados (no caso n = 27). Para mesclar as diferentes matrizes de Q e gerar um consenso das 20 iterações de k = 2 o software CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007) foi utilizado. Os resultados obtidos foram plotados através do *distruct* (Rosenberg 2004).

Visando uma abordagem mais detalhada e aprofundada dos híbridos, foi utilizado o software Newhybrids (Anderson & Thompson 2002). A abordagem é semelhante à realizada pelo Structure (Hubisz *et al.* 2009), porém o Newhybrids (Anderson & Thompson 2002) é capaz de detectar os parentais (P1 e P2), as gerações de híbridos F1 e F2 e também retrocruzamentos entre os parentais e híbridos (Bx1 e Bx2). Para sua utilização foi necessário dividir as populações conforme Saddi (1982), em identificadas como *K. grandiflora*, *K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*, pois o software é incapaz de funcionar corretamente com mais de dois parentais.

O único programa que utilizou a planilha com a leitura codominante foi o Structure (Hubisz *et al.* 2009), cujas análises foram rodadas para 666 indivíduos.

Os softwares Arlequin (Excoffier & Lischer 2010) e Popgene (Yeh *et al.* 1999.) realizaram as análises com a planilha dos dados lidos de maneira dominante e exclusão de indivíduos com até 30% de dados faltantes.

O NTSys (Rohf 2000) foi utilizado na conversão de arquivos para o Fitopac (Shepherd 2008). E os softwares Fitopac (Shepherd 2008) e Newhybrids (Anderson & Thompson 2002) realizaram as análises com a planilha dos dados lidos de maneira dominante e exclusão de indivíduos com até 20% de dados faltantes (os programas não conseguiram realizar a análise com a outra planilha). A exclusão diferencial de dados mostrou-se necessária para que alguns dos softwares pudessem realizar as análises; o critério de exclusão inicial era de 30% e foi mantido, quando possível, para reduzir a perda de dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram utilizados 16 *primers*, dos quais 12 foram amplificaram em todas as populações e foram polimórficos, permitindo a construção de duas matrizes de dados: uma para leitura dos marcadores como codominantes (12 locos para 710 indivíduos) e uma considerando-os dominantes (336 “locos” para 710 indivíduos).

Com a matriz de dados codominates foram realizadas as análises no programa Structure 2.3.3 (Hubisz *et al.* 2009). Para tais análises, indivíduos com mais de 30% de dados faltantes foram excluídos, resultando num total de 666 utilizados. Devido à origem poliploide destes indivíduos, é interessante esta abordagem uma vez que ela considera ambiguidades na leitura (em poliploides é extremamente difícil determinar a quantidade de vezes que um alelo está presente) e reduz a perda de informações.

A partir dos resultados gerados, o agrupamento que melhor explicaria os dados foi obtido através do cálculo do delta K (Evanno 2005, Dent & von Holdt 2011), cujo valor foi 2.

Os resultados foram analisados e editados através dos softwares CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg 2007) e *distruct* (Rosenberg 2004) e estão representados na Figura 2.

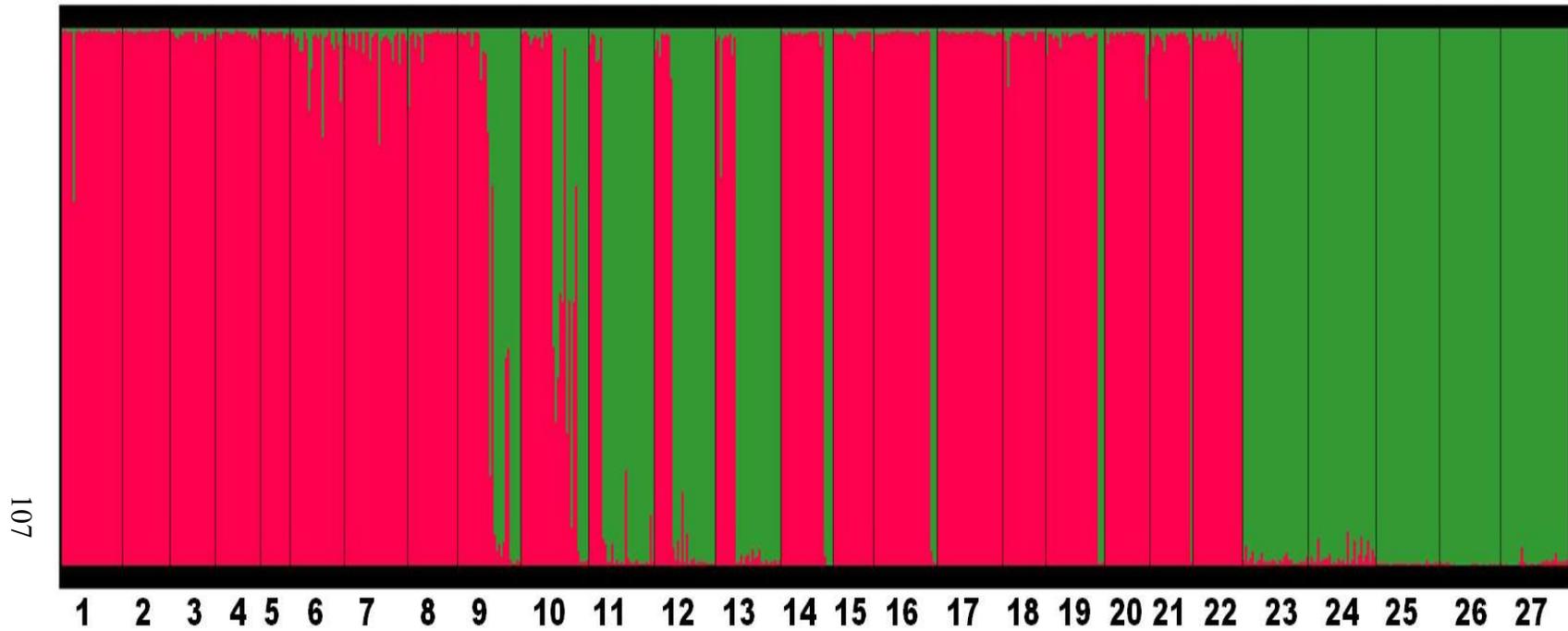


Figura 2: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Structure para  $k=2$  dividido por estados e populações. Cada colluna representa um indivíduo e cada cor um "pool" gênico. Bahia: 1-4, Distrito Federal: 5-8, Goiás: 9-13, Minas Gerais: 14-18, Mato Grosso: 19-22, São Paulo: 23 e Tocantins: 24-27.

Conforme a figura é possível identificar dois “pools” gênicos, representados em verde e vermelho. Com relação aos dados, algumas observações são de extrema importância:

- interessante, a ocorrência de híbridos só é indicada para o estado de Goiás, que geograficamente localiza-se em uma região central;
- a análise não foi capaz de identificar as espécies *K. coriacea* e *K. grandiflora*, nem de indicar uma estruturação genética relacionada às espécies;
- a formação de híbridos entre as três possíveis espécies (para melhor compreensão ver capítulo de taxonomia) é sugerida baseada na diversidade de morfologias intermediárias observadas em herbários e coletadas. Tal situação dificultaria a “leitura” dos dados pelo programa uma vez que além de a distância geográfica com frequência interferir na diferenciação genética das populações, há ao menos seis diferentes categorias possíveis (espécie 1, espécie 2, espécie 3, espécie 1 x espécie 2, espécie 1 x espécie 3 e espécie 2 x espécie 3).

Estranhamente a população 23, correspondente a indivíduos de *K. grandiflora* coletados no estado de São Paulo, tem seus indivíduos classificados no mesmo “pool” gênico que as populações de Tocantins (24 a 27) e Goiás (9 a 13). O fluxo entre essas populações é possível e caracterizaria uma espécie com dispersão vertical, porém não reflete o fato de todas as populações coletadas no Tocantins pertencerem a *K. coriacea*.

Visando compreender se a estruturação proposta refletia adequadamente os dados, alguns testes foram realizados no programa Structure (as populações foram divididas nessas categorias conforme características morfológicas *sensu* Saddi 1982):

- 1 – Somente dados de *K. grandiflora*.
- 2 – Somente dados de *K. coriacea*.
- 3 – Somente dados de *K. coriacea* subsp. *coriacea*.
- 4 – Somente dados de *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.
- 5 – Testada a retirada de um ou dois marcadores para verificar a robustez dos resultados.

Em todos os casos, o valor do delta K (Evanno 2005) foi 2, sugerindo que mesmo quando se tem o conjunto de dados formado por somente o que é considerado uma espécie não há a estruturação em populações (indicativo de existência de fluxo), mas são encontrados 2 grupos.

Os agrupamentos apresentados para valores de k diferentes de 2, embora não prováveis conforme o cálculo do delta K, podem refletir algumas informações a respeito

dos dados. Essa situação pode ser observada nos maiores valores de  $k$  (no caso  $k > 20$ ), quanto mais próximo de 27 está o  $k$ , com maior exatidão torna-se possível identificar as populações.

Os outros programas utilizados não permitem a utilização da planilha com a leitura do marcador como codominante para poliploides, de forma que a partir de agora será utilizada a planilha dominante (0 representando a ausência e 1 a presença).

#### 1. Fitopac (Shepherd 2008)

O agrupamento pelo critério do UPGMA, obtido a partir da matriz gerada através do cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, apresentou boa correlação cofenética (0,7114). Neste caso, foram excluídos indivíduos com mais de 20% de dados ausentes, totalizando 545 indivíduos.

A situação representada na Figura 3 indica que a espécie (*sensu* Saddi 1982 e considerando cada uma das duas subespécies de *K. coriacea* uma categoria distinta) não é responsável pelo agrupamento e populações dos mesmos estados estão são mais semelhantes, mesmo que de espécies diferentes, do que populações de estados distintos. Na Figura 4, os indivíduos são agrupados por localidade geográfica, sugerindo que a distância interfere consideravelmente no fluxo uma vez que maior parte dos estados (cada cor corresponde a um estado) apresentou seus indivíduos agrupados. Estes resultados sugerem que dada a grande semelhança entre os táxons pertencentes ao complexo *K. coriacea* a distância geográfica apresenta um papel fundamental, permitindo que haja fluxo entre populações mais próximas. Isso acarreta em maior diferenciação genética quanto maior a distância geográfica.

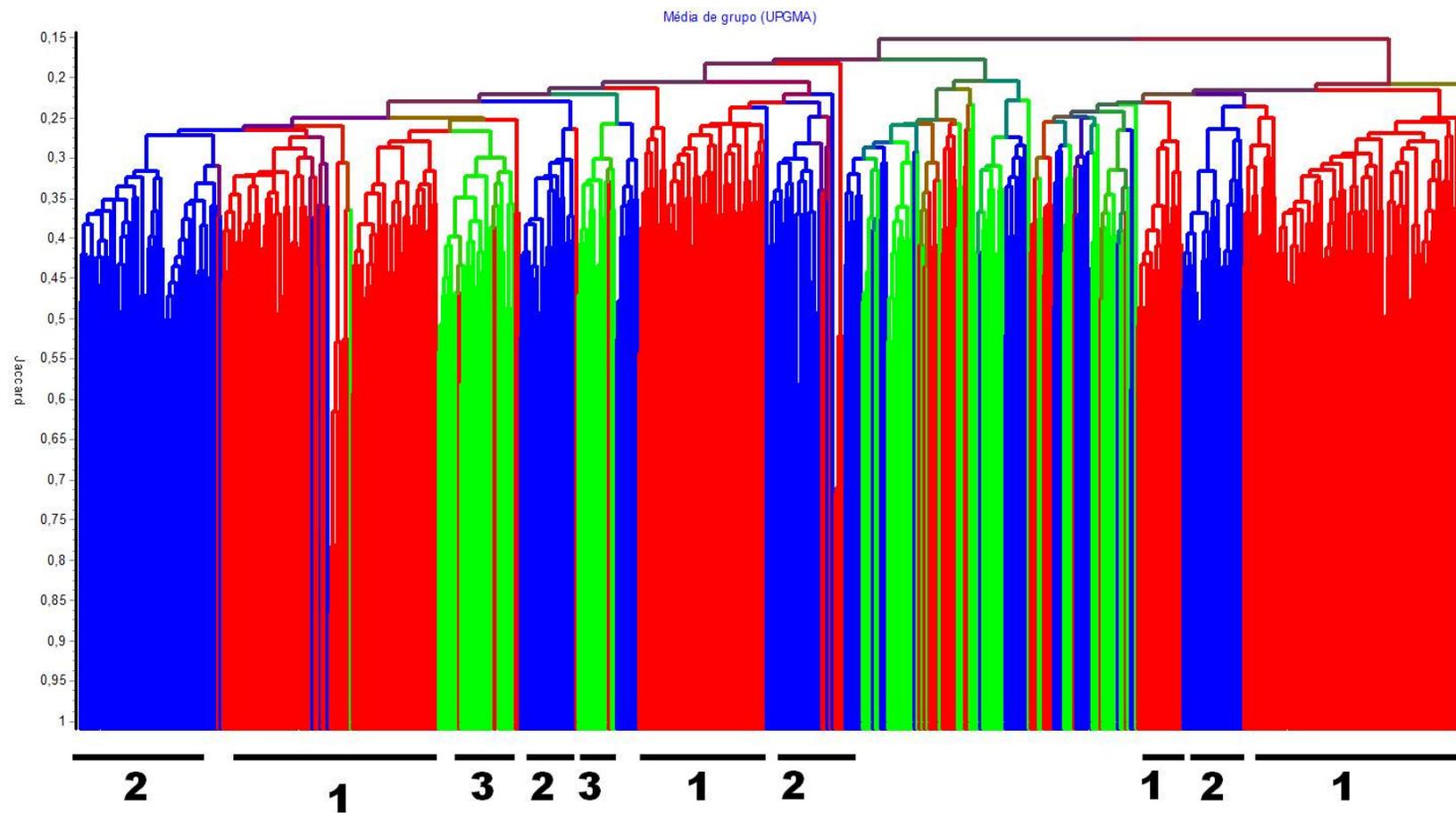


Figura 3: Agrupamento pelo método do UPGMA com dendrograma colorido conforme a categoria taxonômica sensu Saddii (1982). 1 – *K. coriacea* subsp. *coriacea*, 2 – *K. grandiflora* e 3 – *K. coriacea* subsp. *tomentosa*.

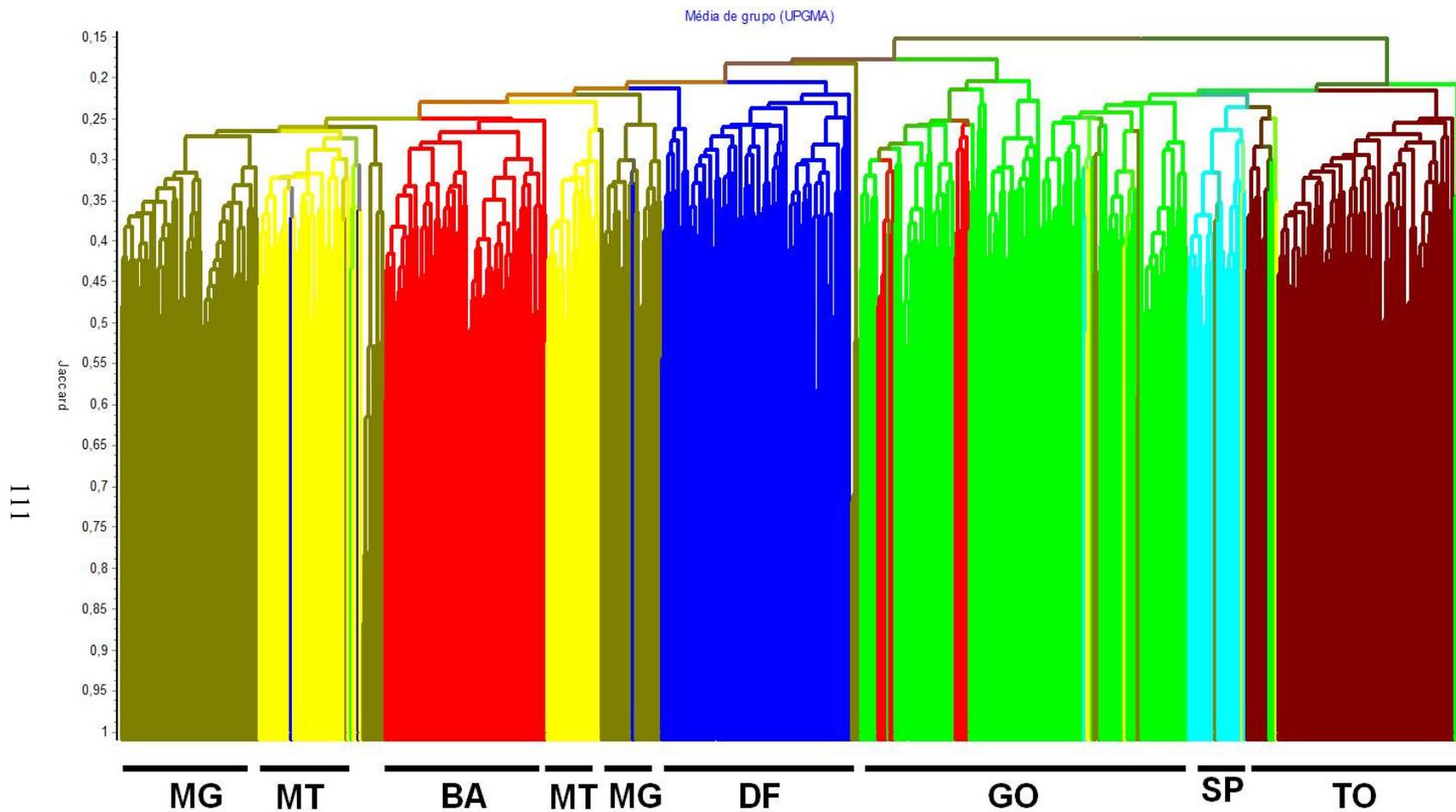


Figura 4: Agrupamento pelo método do UPGMA com as populações representadas no dendrograma colorido conforme a localidade geográfica. MG – Minas Gerais, MT – Mato Grosso, BA – Bahia, DF – Distrito Federal, GO – Goiás, SP – São Paulo e TO – Tocantins.

## 2. Popgene (Yeh *et al.* 1999)

Para análises no programa Popgene (Yeh *et al.* 1999) foi utilizada a planilha dominante com exclusão de indivíduos com mais de 30% de dados ausentes, totalizando 663. Nele, foi calculado o índice de diversidade de Shannon para cada população (Tabela 2).

Tabela 2: Valores obtidos para o índice de diversidade de Shannon por população.

População	Estado	Índice de diversidade de
		Shannon
1	BA	0,1833
2	BA	0,1571
3	BA	0,1934
4	BA	0,1675
5	DF	0,1658
6	DF	0,1853
7	DF	0,1930
8	DF	0,1989
9	GO	0,2259
10	GO	0,2097
11	GO	0,1728
12	GO	0,2187
13	GO	0,2048
14	MG	0,1803
15	MG	0,1713
16	MG	0,1726
17	MG	0,1694
18	MG	0,1654
19	MT	0,1849
20	MT	0,1790
21	MT	0,1593
22	MT	0,1703
23	SP	0,1848
24	TO	0,1875

25	TO	0,1649
26	TO	0,1716
27	TO	0,1813

---

Os maiores valores obtidos para o índice de diversidade são observados nas populações do estado de Goiás. Interessantemente é para estas mesmas populações que o Structure (Hubisz *et al.* 2009) indica a existência de indivíduos parentais e híbridos.

### 3. Arlequin (Excoffier & Lischer 2010)

Neste software também foram utilizados os dados de indivíduos com até 30 % de dados ausentes. Foram realizadas as análises com três possíveis agrupamentos dos dados:

1 – como se todas as populações comportassem-se como subpopulações de uma única população: nesse caso, haveria necessariamente bastante fluxo gênico por todo o cerrado, pouca diferenciação entre as populações e as espécies seriam extremamente semelhantes geneticamente (Tabela 3);

2 – grupos formados conforme a localidade geográfica da população: essa situação seria representada por maior fluxo gênico entre as populações coletadas no mesmo estado (estariam mais próximas e mais sujeitas a “contato” através de eventos de polinização e dispersão), gerando diversidade estruturada entre os grupos e entre as populações (Tabela 4);

3 – grupos organizados por espécie (*K. coriacea* e *K. grandiflora*) e subespécie (*K. coriacea* subsp. *coriacea* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*): esta situação seria refletida por grande parte da diversidade estruturada entre as populações de uma mesma localidade geográfica e, principalmente, entre os grupos; uma vez que cada um deles corresponde a um táxon distinto, espera-se maior fluxo dentro dos grupos (Tabela 5).

Tabela 3: Distribuição da diversidade considerando as 27 populações.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem de variação
Entre populações	4624,127	6,72026	20,10108
Dentro das populações	15438,606	26,71206	79,89892
Total	20062,733	33,43232	100

Tabela 4: Distribuição da diversidade considerando as 27 populações organizadas conforme o estado geográfico.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem de variação
Entre estados	2452,427	3,45648	10,20457
Entre populações dentro dos estados	2171,7	3,70335	10,9334
Dentro das populações	15438,606	26,71206	78,86204
Total	20062,733	33,87189	100

Tabela 5: Distribuição da diversidade considerando as 27 populações divididas por espécie e subespécies – *K. coriacea* subsp. *coriacea*, *K. coriacea* subsp. *tomentosa* e *K. grandiflora*.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem de variação
Entre espécies	473,643	0,29779	0,88783
Entre populações dentro das espécies	4150,484	6,53131	19,47251
Dentro das populações	15438,606	26,71206	79,63966
Total	20062,733	30,54116	100

A Tabela 3 sugere que há bastante diversidade entre as populações (cerca de 20%), indicando a estruturação destas. A causa dessa estruturação da diversidade,

interessantemente, não está relacionada às espécies e subespécies; como pode ser observado na Tabela 5, aproximadamente 0,01% da diversidade está entre as espécies. E com relação à divisão em grupos por localidade geográfica (Tabela 4), parte da diversidade encontra-se entre os estados e parte entre as populações; mas ainda assim a grande maioria está dentro das populações, indicando a existência de fluxo entre estas.

#### 4. Newhybrids (Anderson & Thompson 2002)

O software realizou as análises a partir da matriz de dados dominantes com exclusão de indivíduos com mais de 20% de dados faltantes. A importância desta análise consiste na maior capacidade de distinção de classes de híbridos, uma das limitações do Structure. O Newhybrids permite que sejam identificados os parentais, as gerações F1, F2 e retrocruzamentos com os parentais, garantindo melhor resolução, principalmente em casos em que a taxa de hibridização esperada é elevada.

Como uma maneira de testar a hipótese de que o Structure não estava sendo capaz de compreender os dados devido à possibilidade de grande quantidade de híbridos, os grupos escolhidos para realizar a análise no Newhybrids foram: *K. coriacea* subsp. *coriacea* (Figura 5), *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (Figura 6) e *K. grandiflora* (Figura 7). Sendo esses táxons correspondentes a três possíveis espécies conforme explicado no capítulo de taxonomia (organizados nas figuras conforme a Tabela 6).

##### 1. *K. coriacea* subsp. *coriacea* (Figura 5 e Tabela 6)

Como é possível observar na Figura 5, as populações da Bahia (BA I e BA III) são formadas completamente por um dos tipos de parental, assim como as populações do Distrito Federal (DF I, DF III e DF IV). Porém o estado de Goiás chama a atenção novamente, pois apresenta duas populações (GO III e GO IV) com poucos indivíduos de um dos parentais e a grande parte delas composta tanto pelo outro parental quanto por retrocruzamentos com este. Minas Gerais e Mato Grosso apresentem as populações quase totalmente formadas pelo mesmo parental encontrado na Bahia e no Distrito Federal (P1), exceto por um ou outro indivíduo F1 ou F2. E, finalmente, Tocantins destaca-se dos outros estados por apresentar todas as populações compostas pela outra forma de parental (P2), encontrada somente em Goiás. Nesse contexto, é compreensível que Goiás, por sua localização central apresente inúmeros indivíduos de retrocruzamento com a forma parental P2 e alguns indivíduos P1.

Merece destaque a observação de que as populações DF III e DF IV são simpátricas e de difícil distinção morfológica, exceto pela presença de tricomas em uma delas. O fato de terem mostrado-se semelhantes no gráfico indica que o caráter presença/ausência de tricomas, como sugerido no capítulo de taxonomia, deve ser visto com muita cautela e, sozinho, pode não ser de grande utilidade na identificação das espécies do complexo *K. coriacea*.

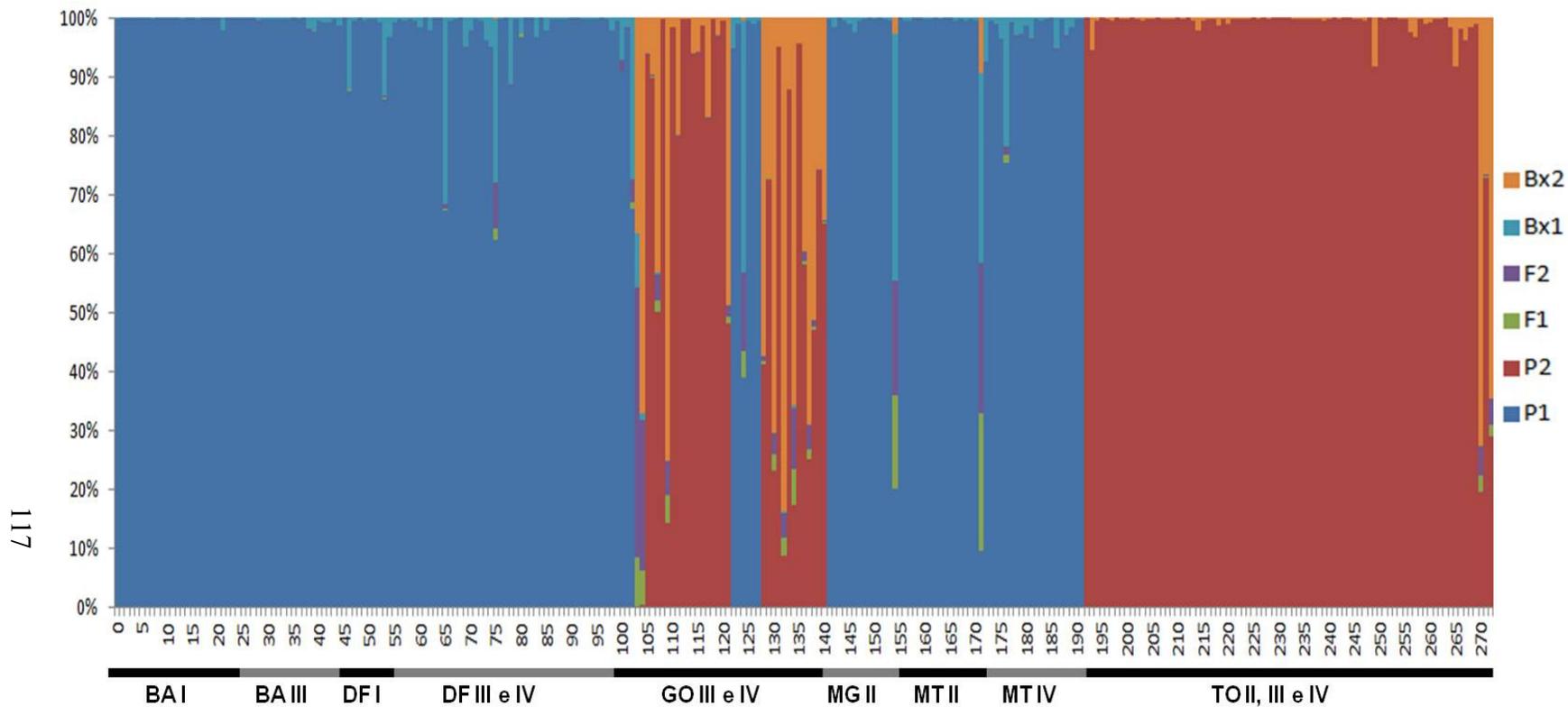


Figura 5: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids *para K. coriacea* subsp. *coriacea* dividido por populações, conforme a Tabela 6. Cada coluna representa um indivíduo e cada cor um “pool” gênico. BA: Bahia, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, MT: Mato Gross, TO: Tocantins. P1: parental 1, P2: parental 2, F1: geração híbrida a partir de P1xP2, F2: geração híbrida a partir de F1xF1, Bx1: retrocruzamento com o parental 1, Bx2: retrocruzamento com o parental 2.

## 2. *K. coriacea* subsp. *tomentosa* (Figura 6 e Tabela 6)

Esse é o caso com as separações menos complexas, pois não foram encontradas as duas formas parentais (P1 e P2) juntas em nenhuma das populações. Na Bahia, a população BA II é composta somente por parentais P1 e a BA IV apresenta maioria dos indivíduos P1 e alguns indivíduos híbridos de retrocruzamento com o parental P1. Em Goiás as duas populações (GO II E GO V) são formadas por parentais P2 e indivíduos híbridos de retrocruzamento com essa forma parental

Finalmente, assim como no caso de *K. coriacea* subsp. *coriacea*, Minas Gerais teve sua população formada por parentais P1, a mesma forma encontrada na Bahia, mas não em Goiás.

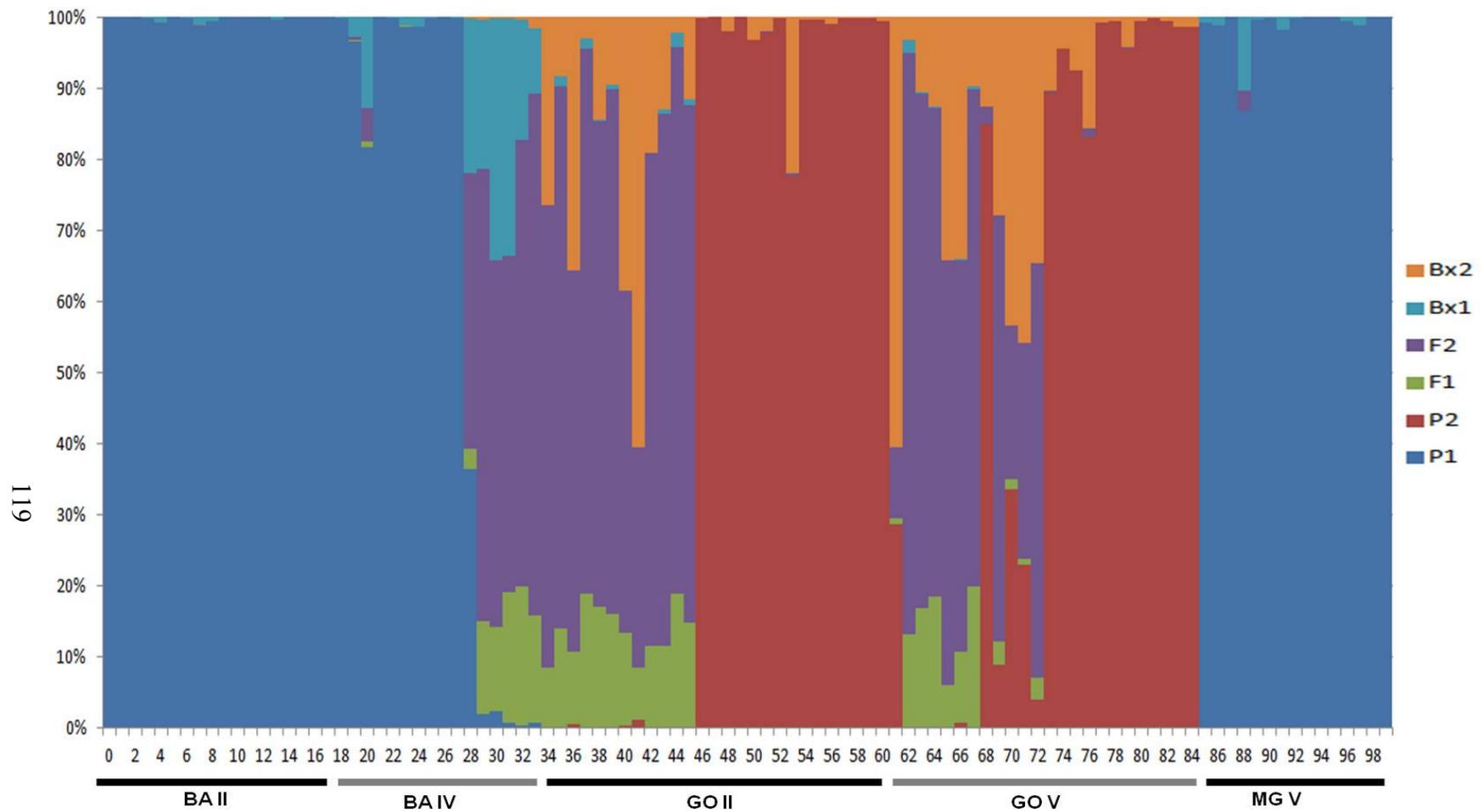


Figura 6: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids para *K. coriacea* subsp. *tomentosa* dividido por populações, conforme a Tabela 6. Cada coluna representa um indivíduo e cada cor um “pool” gênico. BA: Bahia, GO: Goiás, MG: Minas Gerais. P1: parental 1, P2: parental 2, F1: geração híbrida a partir de P1xP2, F2: geração híbrida a partir de F1xF1, Bx1: retrocruzamento com o parental 1, Bx2: retrocruzamento com o parental 2.

### 3. *K. grandiflora* (Figura 7 e Tabela 6)

Os resultados desta espécie foram um pouco mais complexos, pois indicaram populações formadas pelos dois parentais, assim como por parentais e formas híbridas. A população do Distrito Federal apresentou grande quantidade de indivíduos retrocruzados com o parental P2 assim como alguns parentais P2. Novamente Goiás surge como uma situação diferente, pois parte da população é formada por indivíduos retrocruzados com o parental P2 e parte corresponde a parentais P1. As populações de Minas Gerais estranhamente apresentaram alguns indivíduos parentais P1 nas populações, embora a grande maioria seja de parentais P2. Neste caso o estado de São Paulo merece destaque por ter toda sua população composta pela forma parental P1.

Novamente Goiás e São Paulo são estados que se diferenciam dos outros geneticamente, um fato muito curioso.

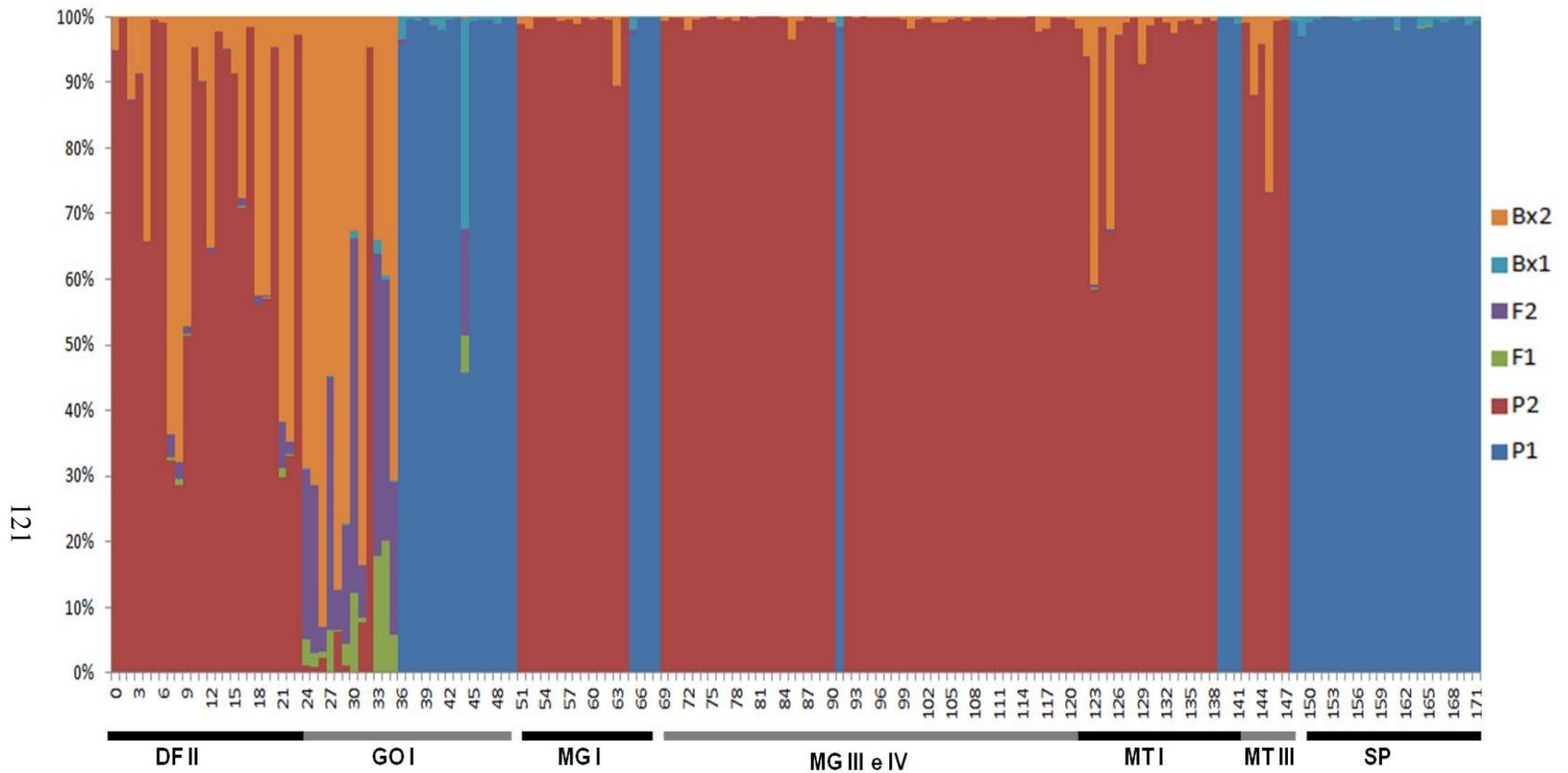


Figura 7: Agrupamento realizado a partir dos resultados do Newhybrids para *K. grandiflora* dividido por populações, conforme a Tabela 6. Cada coluna representa um indivíduo e cada cor um “pool” gênico. BA: Bahia, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, MT: Mato Gross, SP: São Paulo, TO: Tocantins. P1: parental 1, P2: parental 2, F1: geração híbrida a partir de P1xP2, F2: geração híbrida a partir de F1xF1, Bx1: retrocruzamento com o parental 1, Bx2: retrocruzamento com o parental 2.

Tabela 6: Populações utilizadas nas análises pelo Newhybrids.

Figura 6		Figura 7		Figura 8	
Indivíduos	População	Indivíduos	População	Indivíduos	População
0-24	BA I	0-17	BA II	0-23	DF II
25-43	BA III	18-33	BA IV	24-50	GO I
45-54	DF I	34-60	GO II	51-68	MG I
55-99	DF III E IV*	61-84	GO V	69-120	MG III E IV
100-140	GO III E IV	85-99	MG V	121-141	MT I
141-154	MG II			142-148	MT III*
155-172	MT II*			149-171	SP
173-191	MT IV				
192-272	TO II, III E IV				

\* populações simpátricas

#### 4. Considerando o Newhybrids e as outras análises

O Newhybrids não forneceu resultados completamente distintos do Structure, porém a hipótese de que o segundo software não estava apresentando capacidade de resolução necessária à compreensão dos dados foi comprovada dada a inúmera quantidade de formas derivadas de retrocruzamentos que pode ser observada nas Figuras 5, 6 e 7.

Interessantemente a análise bayesiana realizada pelo Structure já apontava para diferenças genéticas muito claras entre os estados de São Paulo e Tocantins e o restante (Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso e o Distrito Federal) e sugeria Goiás como uma situação intermediária, o que é refletido também nos maiores valores do índice de diversidade de Shannon obtidos para este estado.

A presença de muito híbridos em Goiás e a presença de populações mistas (não formadas unicamente por uma das classes de indivíduos) pode ser compreendida por sua localização geográfica: Goiás é um estado central, assim fica relativamente próximo de todos os outros estados. Além disso, tanto numa situação de dispersão vertical quanto na horizontal da espécie, os indivíduos (provavelmente na forma de semente) passariam por Goiás podendo deixar descendentes.

As situações de Tocantins e São Paulo ainda não foram bem compreendidas. São Paulo não apresenta total isolamento (faz fronteira com Minas Gerais, Paraná e Mato Grosso do Sul – das áreas de distribuição de *K. coriacea*), assim como o Tocantins (faz

fronteira com Bahia, Goiás e Mato Grosso), porém são limites de distribuição da espécie. O fluxo gênico entre os estados ocorre, como é possível perceber através das figuras que não há muita diferenciação (não foram identificados o mesmo número de “pools” gênicos que de estados), porém há algo impedindo esse fluxo com os estados do Tocantins e de São Paulo, uma vez que ambos aparecem isolados em todas as análises realizadas.

## 5. Considerações finais

Com base nos resultados obtidos até o momento é possível afirmar que a divisão taxonômica proposta por Saddi (1982) não deve ser considerada adequada ao complexo, uma vez que o autor uniu categorias distintas morfológica, anatômica e geneticamente. Os dados sugerem a necessidade de melhor estudo do estado de Goiás, pois várias das situações com morfologia intermediária provavelmente ocorrem neste estado, o que possibilitaria um entendimento das formas híbridas.

Claramente Tocantins apresenta-se como um caso único e que merece mais atenção; as plantas deste estado frequentemente apresentam folhas pecioladas (característica descrita como rara para a espécie *K. coriacea*) e seria interessante verificar se as populações presentes neste estado têm origem de alguma outra possível espécie ou se as diferenças genéticas tão grandes resultam de isolamento por um período de tempo muito longo.

O esforço amostral foi grande, mas dada a extensão do território brasileiro algumas áreas-chave, como o sudoeste do estado de Minas Gerais, o oeste de Goiás, Mato Grosso do Sul, Rondônia e o norte do Paraná deveriam ser incluídas em projetos futuros de modo a complementar os dados obtidos neste trabalho.

Os dados sugerem que a situação apresentada por Caddah (2009) de hibridação entre as duas espécies (*K. coriacea* e *K. grandiflora*) pode ter sido subestimada. Ao aumentar a área amostrada, o número de locos utilizados e de indivíduos genotipados, as análises não ficaram extremamente claras e nem permitiram identificação com exatidão das categorias taxonômicas propostas, o que não foi o caso para Caddah. Somente o software Newhybrids permitiu uma visualização melhor dos dados. Como pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7, a frequência de populações híbridas é elevada, mesmo que atualmente só haja um dos dois tipos de parental presente em cada população. Esse resultado sugere que em algum momento houve contato entre estes parentais e, assim, fluxo gênico.

Apesar de terem sido realizadas numerosas análises, muitas ainda serão necessárias para a compreensão do complexo *K. coriacea*. Seria de grande utilidade e importância tentar usar um marcador de evolução mais lenta visando tentar obter uma resolução mais clara.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, E.C. & THOMPSON, E.A. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*. 160: 1217-1229.
- ARCOT, S.S., WANG, Z., WEBER, J.L., DEININGER, L. & BATZER, M.A. 1995. Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics*. 29:136-144.
- BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11: 155-165.
- BARRENECHE, T., BODENES, C., LEXER, C., TRONTIN, J.F., FLUCH, S., STREIFF, R., PLOMION, C., ROUSSEL, G., STEINKELLNER, H., BURG, K., FAVRE, J.M., GLOSSL, J. & KREMER, A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1090-1103.
- BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Biotechnology*. 8: 930-932.
- BORÉM, A. 1998. Melhoramento de plantas. 2ª ed. Viçosa. UFV. 453p.
- BOUZAT, J.L. 2010. Conservation genetics of population bottlenecks: the role of chance, selection, and history. *Conservation Genetics*. 11: 463–478.
- CADDAH, M.K. 2009. Estudos taxonômicos no complexo *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae). Unpublished MSc Thesis, Universidade Estadual de Campinas.
- CAVALLARI, M.M., GIMENES, M.A., BILLOT, C., TORRES, R.B., ZUCCHI, M.I., CAVALHEIRO, A.J. & BOUVET, J.M. 2010. Population genetic relationships between *Casearia sylvestris* (Salicaceae) varieties occurring sympatrically and allopatrically in different ecosystems in south-east Brazil. *Annals of Botany*. 106: 627-636.
- CHAMBERS, G.K. & MACAVOY, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 455-476.
- CHASE, M., KESSELI, R. & BAWA, K. 1996. Microsatellite Markers for Population and Conservation Genetics of Tropical Trees. *American Journal of Botany*. 83 (1): 51-57.

COLE, C.T. 2003. Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 213-23.

CRESTE, S., TULMANN NETO, A. & FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 299–306.

CUI, L., WALL, P.K., LEEBENS-MACK, JH *et al.* 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*. 16: 738-749.

DAYANANDAN, S., BAWA, K.S. & KESSELI, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). *American Journal of Botany*. 84: 1658-1663.

DENT, A.E. & vonHOLDT, B.M. 2011 STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 1-34. DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.

DIERINGER, D. & SCHLÖTTERER, C. 2003. Two Distinct Modes of Microsatellite Mutation Processes : Evidence From the Complete Genomic Sequences of Nine Species. *Genome Research*. 13 (10): 2242-2251.

DOKHOLYAN, N.V., BULDYREV, S.V., HAVLIN, S. & STANLEY, H.E. 2000 Distributions of dimeric tandem repeats in noncoding and coding DNA sequences. *Journal of Theoretical Biology*. 202: 273-282.

DONNELLY, M.J. & TOWNSON, H. 2000. Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis*. *Eastern Africa. Insect Molecular Biology*. 9: 357-367.

DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11–15.

DRUMMOND, C.S. & HAMILTON, M.B. 2007. Hierarchical components of genetic variation at a species boundary: population structure in two sympatric varieties of *Lupinus microcarpus*. (Leguminosae). *Molecular Ecology*. 16: 753-769.

ELLEGREN, H. 1991. DNA typing of museum birds. *Nature*. 354: 113-113.

ELLEGREN, H. 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites — a new approach to studies of genetic relationships in birds. *The Auk*. 109: 886-895.

ELLEGREN, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*. 16: 551-558.

ELLEGREN, H. MOORE, S., ROBINSON, N. *et al.* 1997. Microsatellite evolution — a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 854-860.

- ELLEGREN, H., PRIMMER, C.R. & SHELDON, B.C. 1995. Microsatellite evolution — directionality or bias. *Nature Genetics*. 11: 360-362.
- ERIKSSON, O., EHRLÉN, J. 2001. Landscape fragmentation and the viability of plant populations. In: Silvertown, J. & Antonovics, J. (eds.). *Integrating ecology and evolution in a spatial context*. Blackwell Science. Oxford. pp 157-175.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation Study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- FERES, F., SOUZA, A.P., AMARAL, M.C.E., BITTRICH, V. 2005. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. *Revista Brasileira de Botânica*. 28: 277-283.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D.. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD, RFLP em análise genética. Brasília. EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- FIELD, D. & WILLS, C. 1998. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 263: 209-215.
- FRANKEL O.H. & SOULÉ, M.E. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- FRANKHAM, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation*. 126: 131-140.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto. SBG. 280p.
- FRANKHAM, R., BRISCOE, D.A. & BALLOU, J.D. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- GARCIA, A.A.F., BENCHIMOL, L.L., BARBOSA, A.M.M, GERALDI, I.O., SOUZA JR., C.L. & SOUZA, A.P. de. 2004. Comparison of RAPD, PFLP and SSR methods for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*. 27: 579-588.
- GARRIS, A.J., TAI, T.H., COBRUN, J., KRESOVICH, S. & MCCOUCH, S. 2005. Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*. 169: 1631–1638.
- GEGEAR, R.J. & BURNS, J.G. 2007. The birds, the bees, and the virtual flowers: can
- GERLACH, G & MUSOLF, K.F. 2000. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Conservation Biology*. 14: 1066-1074.

- GOTTLIEB, L.D. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science*. 216: 373-380.
- HAMADA S.R., PETRINO, M.G. & KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79 (21): 6465-6469
- HAMRICK, J.L., GODT, M.J., MURAWSKI, D.A. & LOVELESS, M.D. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk, D.A. & Holsinger, K.E. (eds.). *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press. New York. pp 75–86.
- HANSKI, I. & SIMBERLOFF, D. 1997. The Metapopulation approach, its history, conceptual domain and application to conservation. In: Hanski, I. & Gilpin, M.E. (eds.). *Metapopulation biology*. Academic Press, Inc. New York. pp 5–26.
- HARTL D.L. & CLARK, A.G. 1988. *Principles of population genetics*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, USA
- HARTL D.L. & CLARK, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, USA.
- HEDRICK, W. 2001. Conservation genetics: Where are we now? *Trends in Ecology and Evolution* 16:629-636.
- HUBISZ, M.J., FALUSH, D., STEPHENS, M. & PRITCHARD, J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*. 9(5):1322-1332.
- JAKOBSSON, M. & ROSENBERG, N.A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23 (14): 1801-1806.
- KANE, N.C., KING, M.G., BARKER, M.S. *et al.* 2009. Comparative genomic and population genetic analyses indicate highly porous genomes and high levels of gene flow between divergent *Helianthus* species. *Evolution*. 63: 2061-2075.
- KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S. & THOMAS, M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*. 38: 349-355
- KREBS, J.R. & DAVIES, N.B. (eds.). 1997. *Behavioural Ecology*. 4<sup>a</sup>. ed. Blackwell Science, Oxford.

- LANDE, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241: 1455-1460.
- LAURANCE W.F. & BIERREGAARD, R.O. (eds.). 1997. *Tropical Forest Remnants*. Chicago University Press. Chicago, USA.
- LAWTON-RAUH, A. 2003. Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 396-409.
- LEIMU, R., MUTIKAINEN, P., KORICHEVA, J. & FISHER, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*. 94: 942-952.
- LEVINE, I., CHENG, H. BACTER, J. & HILLEL, J. 1995. Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken specific primers. *Animal Genetics*. 26: 107-110.
- LEXER, C. FAY, M.F., JOSEPH, J.A., NICA, M.S. & HEINZE, B. 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology*. 14: 1045-1057.
- LI, Y.C., KOROL, A.B., FAHIMA, T., BEILES, A. & NEVO, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11: 2453-2465.
- MALLET, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20: 229-237.
- MILLAR, C.I. & WESTFALL, R.D. 1992. Allozyme markers in forest genetic conservation. *New Forests*. 6: 347-371.
- MINDER, A.M. & WIDMER, A. 2008. A population genomic analysis of species boundaries: neutral processes, adaptive divergence and introgression between two hybridizing plant species. *Molecular Ecology*. 17: 1552-1563.
- MORGANTE, M. & OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*. 3: 175-182.
- OLIVEIRA, P.E.A.M. & SAZIMA, M. 1990. Pollination biology of two species of *Kielmeyera*(Guttiferae) from brazilian cerrado vegetation. *Plant Systematics and Evolution*. 172: 35-49.
- OLIVEIRA, E.J., PÁDUA, J.G., ZUCCHI, M.I. & VENCOVSKY, R. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (2): 294-307.

- ORR, M.R. & SMITH, T.B. 1998. Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 502-506.
- PALSSON, S. 2000. Microsatellite variation in *Daphnia pulex* from both sides of the Baltic Sea. *Molecular Ecology*. 9: 1075-1088.
- PICKETT, S.T.A. & WHITE, P.S. (eds.). 1985. *The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics*. Academic Press. San Diego, USA.
- PINTO, L.R., VIEIRA, M.L.C., SOUZA JR., C.L. & SOUZA, A.P. 2003a. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. *Genetics and Molecular Biology*. 26: 355-364.
- PINTO, L.R., VIEIRA, M.L.C., SOUZA JR., C.L. & SOUZA, A.P. 2003b. Genetic-diversity assessed by microsatellites in tropical maize populations submitted to a high-intensity reciprocal recurrent selection. *Euphytica*. 134: 277-286.
- pollinator behavior drive ecological speciation in flowering plants? *American Naturalist*. 170: 551-556.
- POWELL, W., MACHRAY, G.C. & PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science Reviews*. 1 (7): 215-222.
- REED, D.H., FRANKHAM, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*. 17: 230-237.
- REED, D.H., LOWE, E.H., BRISCOE, D.A. & FRANKHAM, R. 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: effect of inbreeding, prior environment, and lineage. *Evolution*. 57: 1822-1828.
- RIESEBERG, L.H. & WILLIS, J.H. 2007. Plant speciation. *Science*. 317: 910-914.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J., ALIA, R. & GIL, L. 2004. Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology*. 13: 2567-2577.
- ROHLF, J.F. 2000. NTSYSpc: numerical taxonomy system, ver. 2.1. Exeter Software. New York.
- ROSENBERG, N.A. 2004. *Distrupt*: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*. 4: 137-138.
- SADDI, N. 1982. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.
- SAIKI, R.K., SCHARF, F., FALOONA, F. *et al.* 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.

- SCHLÖTTERER, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109 (6): 365-371.
- SCHLÖTTERER, C., AMOS, B. & TAUTZ, D. 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*. 354: 63-65.
- SCHLUTER, D. 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*. 16: 372-380.
- SCHONEWALD-COX, C., CHAMBERS, S.M., MACBRYDE, B. & THOMAS, L. (eds.). 1983. *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*. Benjamin-Cummings, Menlo Park, California, USA.
- SCHUNG, M.D., WETTERSTRAND, K.A., GAUDETTE, M.S. *et al.* 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*. 7: 57-70.
- SHEPHERD, G.J. 2008. *Fitopac v 2.0: manual do usuário*. Dept. de Botânica, UNICAMP, Campinas.
- SITES, J.W. & MARSHALL, J.C. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 462-470.
- SITES, J.W. & MARSHALL, J.C. 2004. Operational Criteria for Delimiting Species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 35: 199-227.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139:457-462.
- SOLTIS, P.S. & SOLTIS, D.E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 7051-7057.
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. & TATE, J.A. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*. 161: 173-191.
- SOULÉ, M.E. 1980. Thresholds for survival: criteria for maintenance of fitness and evolutionary potential. In Soulé, M.E. & Wilcox, B.A. (eds.). *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. pp. 151-170.
- TAUTZ, D. & REINZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12: 4127-4138.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17: 6463-6471.

- TAUTZ, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena, S.D.J, Chakraborty, R., Epplen, J.T. & Jeffreys, A.J. (eds.). DNA fingerprinting: State of science. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. pp. 21-28.
- TEMPLETON, A.R., ROBERTSON, R.J., BRISSON, J. & STRASBURG, J. 2001. Disrupting evolutionary processes: the effect of the habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 5426-5432.
- TIEDEMANN, R., HARDY, O., VEKEMANS, X. & MILINKOVICH, M.C. 2000. Higher impact of female than male migration on population structure in large mammals. *Molecular Ecology*. 9: 1159-1163.
- TÓTH, G., GÁSPARI, Z. & JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
- VÄLI, Ü., EINARSSON, A., WAITS, L. & ELLEGREN, H. 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*. 17: 3808–3817.
- WANG, Z., WEBER, J.L., ZHONG, G. & TANKSLEY, S.D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*. 88: 1-6.
- WEBER, J.L. & MAY, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*. 44: 388-396.
- WHITTEMORE, A.T. 1993. Species concepts: a reply to Ernst Mayr. *Taxon*. 42: 573-583.
- WIENS, J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*. 58: 193-197.
- WIERDL, M., DOMINSKA, M. & PETES, T.D. 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics*. 146: 769-779.
- WILDER, J. & HOLLOCHER, H. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution*. 18: 384-392.
- WILLI, Y., VAN BUSKIRK, J. & HOFFMANN, A.A. 2006. Limits to the adaptive potential of small populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 37:433-458.
- WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 16: 97-159.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugenics*. 15: 323-354.
- WRIGHT, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Variability within and Among Natural Populations*. Vol. 4. University of Chicago Press. Chicago, USA.

- YEH, F.C., YANG R. & BOYLE, T. 1999. POPGENE 1.32: Population Genetic Analysis. Programa para computador livre distribuído pelos autores.
- YOUNG, A. & BOYLE, T. 2000. Forest fragmentation. In: Young, A., Boshier, D. & Boyle, T. (eds.). Forest conservation genetics. Principles and practice. CSIRO Publishing-CABI Publishing. United Kingdom. pp 123–134.
- ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.V., PINHEIRO, J.B., BRONDANI, C. & VENCOSKY, R. 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). Molecular Ecology Notes. 2: 512-514.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A partir dos resultados dos estudos anatômicos, uma vez que caracteres anatômicos são altamente conservativos, e das observações taxonômicas (observações de material herborizado e no campo) fica claro que a circunscrição atual da espécie *K. coriacea* como proposta por Saddi (1982) deve ser alterada.

Mallet (2005) afirma que espécies de divergência recente hibridizam quando em simpatria e aparentemente o complexo estudado constitui exatamente essa situação. Na realidade a dificuldade delimitar os táxons pode ser derivada da possível hibridização entre as três espécies. Como mencionado ao longo do trabalho, é muito comum encontrar formas morfológicamente intermediárias e espécies de *Kielmeyera* ocorrendo em simpatria. Décadas atrás Stevens (1980) já havia observado e relatado a mesma situação para o gênero *Callophyllum*, pertencente à mesma família que *Kielmeyera*.

No caso de *K. coriacea*, o período de floração não deve ser um fator que limitaria muito a troca de material genético com outra espécie do gênero uma vez que ela floresce praticamente durante o ano todo (claro que em épocas diferentes nas diferentes localidades geográficas) e apesar de considerada mais restrita a distribuição dos outros dois táxons dos complexo (*K. grandiflora* e *K. coriacea* subsp. *tomentosa*) não é tão reduzida quanto os relatos aparentam.

Além disso, alguns trabalhos como Kane e colaboradores (2009) relatam que em simpatria pode haver a hibridização até mesmo entre espécies relativamente distantes, mas pertencentes ao mesmo gênero. E há numerosos relatos de duas situações:

- 1 – o táxon é muito polimórfico, porém apresenta reduzida diversidade genética – é o caso de espécies com elevada plasticidade fenotípica;
- 2 – o táxon é extremamente uniforme, porém geneticamente há elevada diferenciação – esse é o caso de espécies crípticas ou de espécies em processo de especiação, cujas diferenças morfológicas ainda não estão “visíveis” a não ser através de marcadores moleculares.

O complexo *Kielmeyera coriacea* provavelmente corresponde à segunda situação e as espécies ali incluídas podem estar em processo de especiação. Neste caso é importante a realização de estudos com um bom desenho amostral de modo a garantir que os dois ou mais táxons sejam amostrados e de maneira correta. Estudos de filogenia auxiliam na confecção do desenho, porém para detectar se há fluxo entre os supostos táxons o ideal é a realização de estudos populacionais.

No trabalho atual, seria importante a realização de mais alguns estudos para corroborar a delimitação entre as espécies, de modo a garantir que a nova circunscrição

se aplique à maior parte dos casos observados em campo. Um exemplo disto é a situação de *K. coriacea* subsp. *coriacea* var. *microphylla* (discutida no capítulo de taxonomia).

Entre as possibilidades estão:

- morfometria foliar (para o complexo, as folhas mostraram-se muito mais informativas que as flores, conforme já havia sido observado por Saddi 1982);
- utilização de marcadores de evolução mais lenta, uma vez que estes “detectariam” menos diversidade e tornariam a análise menos confusa dada a quantidade de híbridos;
- o padrão de venação foliar mostrou-se muito característico para cada um dos táxons e uma análise mais profunda tanto anatômica, micromorfológica e morfológica pode fornecer caracteres de grande valia na identificação;
- margem, forma e textura foliares aparentemente são caracteres de grande utilidade ao se estudar o complexo *K. coriacea*;
- como mencionado seria muito interessante a realização de mais coletas e direcionadas, pois até o momento a distribuição do que Cambessèdes descreveu como *K. tomentosa* é completamente incerta (exemplo desta necessidade foi o relato da ocorrência de populações de *K. rubriflora* no Tocantins, local sem registro para a espécie até o momento).

Ainda não é possível afirmar a nova circunscrição, mas a proposta provavelmente será próxima do apresentado:

- 1 - As variedades de *K. coriacea* subsp. *coriacea* devem ser sinonimizadas a *K. coriacea*, uma vez que nem em herbário nem em campo é possível sua identificação através da chave; estas 4 variedades possivelmente constituirão à espécie *K. coriacea* (esta circunscrição aproxima-se muito das fornecidas nas primeiras descrições da espécie).
- 2 - A outra subespécie (*tomentosa*) com certeza inclui o que Cambessèdes descreveu como uma espécie em 1828, porém não se sabe se há somente um táxon ou mais de uma (serão necessárias análises mais detalhadas para se chegar a essa conclusão). De qualquer forma, esta subespécie é tão ou mais distinta de *K. coriacea* subsp. *coriacea* que *K. grandiflora*, tornando incoerente a manutenção da circunscrição atual.
- 3 - *K. grandiflora* é uma espécie relativamente bem estabelecida, mas que merece mais estudos morfológicos.
- 4 - Goiás, São Paulo e Tocantins comportaram-se de maneira interessante nas análises; poucos estudos envolvendo espécies de cerrado abrangem locais tão distantes e

distintos e o caso atual mostrou que é necessário que o número de estudos abrangendo maior parte da distribuição do cerrado aumente.

5 - Finalmente, as populações apresentaram elevado grau de estruturação, sendo assim é importante buscar as causas desse fluxo gênico restrito (o desmatamento é muito recente pra explicar tamanha diversidade concentradas dentro das populações).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMBESSÈDES, J. 1828. Ternstroemiaceae. In: Saint-Hillaire, A. Flora Brasiliae meridionalis, v. I, p. VIII. A. Belin, Paris, pp 296-310.

KANE, N.C., KING, M.G., BARKER, M.S. *et al.* 2009. Comparative genomic and population genetic analyses indicate highly porous genomes and high levels of gene flow between divergent *Helianthus* species. *Evolution*. 63: 2061-2075.

MALLET, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20: 229-237.

SADDI, N. 1982. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading.

STEVENS, P.F. 1980. A revision of the Old World species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61: 117-690.

# ANEXOS

**Anexo 1** – Transcrição das descrições mais importantes com as respectivas ilustrações apresentadas

### 1.1. Martius e a segunda descrição (Nova Genera et Species Plantarum)

*Kielmeyera* Mart. & Zucc.

#### Caracteres diferenciais

Cálice 5-mero. Corola 5-mera, pétalas com laterais desiguais um pouco espessas. Estames hipogínicos, numerosos, livres, decíduos. Estilete não ramificado, estigma lobado. Cápsula trígona, 3-locular, 3-valvar, lignificada, margem – onde ocorre a deiscência – das valvas introflexa. Sementes numerosas, presas no eixo central, bisseriadas e cada lóculo, bracteosas.

#### Caracteres naturais

Cálice hipógino, 5-mero, sépalas coriáceas decíduas, 2 ou 3 externas frequentemente menores, prefloração imbricada. Corola hipogínica, 5-mera, rosácea, prefloração convoluta; pétalas obovadas e desiguais lateralmente, a lateral livre no botão é coriácea e exteriormente com frequência pubescente, cobrindo no botão a outra lateral que é superiormente dilatada. Estames hipogínicos, numerosos, plurisseriados; filetes livres, filiformes, eretos; anteras oblongas, eretas, basifixas, lóculos longitudinalmente deiscentes, pólen grande, subirregular e cheio de esferas/rugosidade na exina. Ovário súpero, 3-locular, óvulos em cada lóculo bisseriados e numerosos. Estilete simples, decíduo. Estigma capitado, 3-5-lobado. Cápsula trígona, 3-locular, 3-valvar, lignificada; valvas com margem introflexa, naviculares, decíduas. Córtex externo verrucoso e interno nitidamente transversalmente rugoso. Sementes orbiculares a transverso-oblongas, comprimidas, bracteosas, diâmetro “longiore perpendiculari”, região do hilo localizada na coluna central, óvulos numerosos em cada lóculo e dispostos em duas fileiras imbricadas. Testa tênue, papirácea, ala circundando o núcleo seminífero. Membrana interna muito fina, aderida à testa. Albúmen nulo. Embrião reto, ortótropo, cotilédones reniformes, largos, espessos (carnosos?) com venação radiada plana “sibi incumbentibus”, radícula curta e cilíndrica.

Hábito: arvoretas com secreção resinosa colorida, ramos esparsos, frequentemente áfilos na parte inferior e geralmente arroxeados. Folhas esparsas,

podendo ser congestas, breve-pecioladas, submarginadas, inteiras, coriáceas, peninérveas, sem estípulas, decíduas. Flores terminais solitárias ou sub-racemosas, largas, especiosas, alvas ou rosas.

*K. coriacea* Mart. & Zucc. (Figura 1)

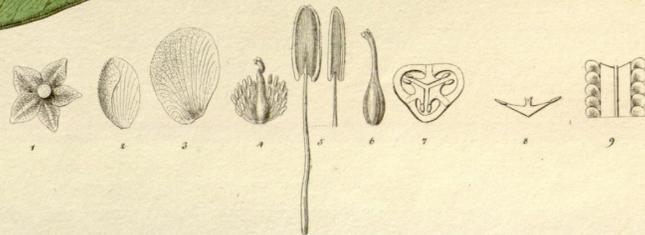
Folhas obovadas-oblongas, subsésseis, coriáceas e espessas, inflorescência terminal subcorimbosa, sépalas ovais, levemente agudas, pétalas com exterior viloso.

---

Árvore pequena. Ramos regularmente cilíndricos e extremamente grossos, secretores de resina; córtex cinza-avermelhado, suberoso. Coberto de cicatrizes de folhas que caíram. Folhas mais próximas no ápice dos ramos (aglomeradas), alternas, base com pecíolo curtíssimo, dificilmente com uma linha carnosa atenuada ao longo, obovado-oblonga, levemente aguda ou obtusa, inteira, coriácea, firme, nervura mediana espessada e alva e nervuras laterais finas e paralelas, sob lupa reticulado-rugosas, nas duas faces glabras, subglaucescente, 4-6 pol de comprimento 2-3 pol de largura; as que estão localizadas abaixo das flores são menores e sésseis, as outras características são semelhantes às outras folhas normais. Pedúnculos, geralmente numerosos, dispostos no ápice dos ramos no corimbo, 2-3-floro, espessado, cilíndricos, tenuemente tomentosos, brácteas da base são bem ovado-agudas, inteiras, coriáceas e com tricomas ferrugíneos; pedicelo unifloro, cilíndrico, com tricomas ferrugíneos, brácteas na base e de meia polegada. Sépalas ovais, levemente agudas, inteiras, coriáceas, carenadas, com face externa tomentosa. Corola aberta com uma polegada e meia, pétalas obovado-suborbiculares, com laterais desiguais, inteiras, face externa um pouco tomentosa, com nervuras radiadas, rósea. Estames mais curtos que o pistilo, glabros, anteras linear-oblongas, amarelas. Ovário oblongo-trígono, ângulos obtusos, glabro, com três lóculos plurióvulados. Estilete circular, glabro, na parte de cima bem pouquinho espesso ou suculento. Estigma espessado, subtrilobado, glabro. Cápsula oblonga, trígona, 3-ocular, sementes orbiculares bracteosas.

Floração em fevereiro.

Tab. 70



Charo. Kuhn del.

KIELMEYERA coriacea.

A. Folger sc.

Figura 1: Ilustração de *K. coriacea* apresentada na obra "Nova genera et species platarum".

## 1.2. A descrição de *K. tomentosa* Cambess. na Flora Brasiliae meridionalis (1828)

### *Kielmeyera*

Cálice persistente, sem brácteas, 5-partido, sépalas imbricadas, duas mais externas frequentemente menores. Pétalas cinco, inseridas no receptáculo, alternas ao cálice, livres, iguais, lateralmente desiguais, prefloração contorta. Estames inseridos no receptáculo carnosos, livres ou raramente levemente fundidos na base, numerosos, glabros: filetes filiformes, persistentes: anteras dorsifixas, móveis, oblongas, biloculares, deiscência longitudinal, conectivo mais ou menos carnosos, às vezes ápice glandular. Pistilo livre. Estilete simples (não ramificado). Estigmas três, fundidos em um ou livres e então ápice trifido, frequentemente emarginado. Ovário inicialmente unilocular, depois os septos se fundem internamente e aí 3-locular. Óvulos numerosos, inseridos em duas fileiras por lóculo, fixos pela região central, imbricados, disciformes. Cápsula 3-locular, 3-valvar, valvas com as margens introflexas; coluna central vai ficando mais fina da base para o ápice, com placenta; cada placenta oposta à valva. Ala das sementes membranácea, sementes comprimidas, oblongas. Hilo localizado na margem da parte mediana da semente. Integumento tênue. Perisperma nulo. Embrião reto, plano; radícula pequena, voltado para a porção deprimida (hilo); cotilédones grandes, reniformes.

Árvores, arbustos ou subarbustos que liberam resina. Folhas esparsas, frequentemente mais densas no ápice dos ramos, sem estípulas, coriáceas, inteiras, uninérveas, ao mesmo tempo as nervuras pinadas podem ser notadas; base do pecíolo articulada. Flores axilares terminais, frequentemente no ápice dos ramos as folhas são menores ou corimbos são reduzidos, racemos, raro panículas: pedúnculo bracteado, base articulada.

### 1 - *K. coriacea*

Caule arborescente; folhas espatuladas, glaucescentes, glabras; inflorescências racemosas; sépalas ovado-agudas, tomentosas, subiguais.

---

Arbustos pequenos, retorcidos, com látex viscoso de coloração esbranquiçada num primeiro momento e depois avermelhada. Ramos espessos, inferiormente glabros e superiormente pubescentes. Folhas alternas, algumas concentradas nos ápices dos

ramos, 3-5 pol de comprimento, 2-5 pol de largura, espatuladas, ápice obtuso brevemente emarginado, espessas, inteiras, glabras, glaucas, rugosas, nervura mediana frequentemente proeminente, nervuras secundárias numerosas, pinadas; subsésseis. Flores no ápice dos ramos curtos, 5 flores por ramificação: pedúnculo 5-12 l de largura, espesso, com muitos tricomas, brácteas da base decíduas. Cálice 5-partido, lobos ovado-agudos, 4 l de comprimento, 2 l de largura, com tricomas curtos na face abaxial, subiguais. Pétalas 2,5 cm de comprimento, 8 l de largura, obovada, inteira, subcarnosa, com laterais desiguais, muitos tricomas na face abaxial, cárneas. Estames duas vezes mais curtos que as pétalas, glabros: anteras inseridas um pouco acima da base, oblongo-lineares, obtusas, base emarginada. Estilete um pouco mais elevado que os estames, trígono, glabro. Estigma capitado, 3-lobado. Ovário ovóideo-trígono, glabro, espesso. Floração em agosto.

## 2 – *K. tomentosa* Cambess. (Figura 2)

Ramos arborescentes; folhas elípticas, obtusas, tomentosas na face abaxial; inflorescência corimbosa; sépalas ovais, tomentosas, subiguais.

---

Ramos arbustivos, cilíndricos, porção mais velha nua, córtex cinza; ápices jovens pubérgulos. Folhas esparsas, subsésseis, elípticas, 3-5 pol de comprimento, 1,5-2 pol de largura, obtusas, margem revoluta (para baixo), frequentemente deflexa, glabra na face adaxial, muito tomentosa na abaxial, nervura mediana e nervuras secundárias proeminentes. Flores organizadas em corimbos simples ou compostos; 5-9 flores: pedúnculo 6-12 l de comprimento, pouco tomentoso, com brácteas subopostas na metade inferior. Sépalas ovais, 2 l de largura, subiguais, tomentosas na face externa, margem escariosa e ciliada. Pétalas obovais-oblongas, lateralmente desiguais, ápice mais longo, 9 l de comprimento, 7 l de largura, alvas, densamente tomentosas na face abaxial. Estames três vezes mais curtos que as pétalas: anteras fixas um pouco acima da base, sublineares, base emarginada, conectivo espesso, ápice glandular. Estilete espesso, subclavado, com tricomas esparsos, do mesmo tamanho dos estames. Estigma espesso, trilobado. Ovário ovóide-trígono, glabro e liso.



Figura 2: Ilustração de *K. tomentosa* apresentada na obra "Flora Brasiliae meridionalis".

### 3 – *K. falcata*

*Kielmeyera*: caule arbóreo; folhas oblongo-subelípticas, subfalcatas, pubérulas; inflorescência racemosa, sépalas ovado-acuminadas, pubescentes, desiguais.

---

Árvore pequena, tortuosa, córtex suberoso, ramos crassos. Folhas aglomeradas no ápice dos ramos, 5-8 pol de comprimento e 1,5-2 pol de largura, obtusas, quando adultas frequentemente falcatas, sésseis, em material herborizado apresentam coloração atro-violácea e com tricomas muito curtos em ambas as faces, mas principalmente na abaxial, nervura central larga, proeminente na face abaxial. Flores em racemos 3-7-floros, curtos: pedúnculo com 4-9 l de comprimento, pubérulo, com brácteas 1-3 lanceoladas e pubérulas. Cálice 5-mero, sépalas ovadas, agudas, 4 l de comprimento e 3 l de largura, cárneas, desiguais e com a face externa pubescente. Pétalas com 9 l de comprimento e largura, margem quase inteira, laterais desiguais, cárneas e externamente com muitos tricomas. Estames duas vezes mais curtos que as pétalas: anteras com inserção do filete levemente acima da base, lineares, base emarginada. Estilete da mesma altura que os estames, subclavado, 3-sulcado, glabro. Estigma trilobado, lobos emarginados. Ovário ovóide-trígono, glabro. Cápsula com 6-8 pol de comprimento ovóide-trígona, longitudinalmente 3-sulcada, crassa. Sementes tênues, comprimidas, ala membranácea contornando todo o núcleo seminífero, glabra, 2,5-3 pol de comprimento, 10 pol de largura. Embrião com uma polegada de comprimento, reto, achatado, cotilédone grande, reniforme, radícula próxima ao hilo. (Descrição de cápsula e sementes feita por A. de St.-Hil. Mss.).

Floração: outubro. Ocorrência São Paulo (Franca)

#### 1.3. Descrições de Pohl (1830)

##### 1 – *K. oblonga* Pohl (Figura 3)

*Kielmeyera*: caule arbóreo, ramificado; folhas sésseis, oblongas, ápice obtuso a suretuso, base atenuada desde o meio da folha, glabras; inflorescências terminais, racemosas; pedúnculos unifloros; sépalas ovais, pubérulas e com margem ciliada.

---

Regiões de ocorrência: Minas Gerais, Goiás.

Tronco arbóreo, lignificado, com medula interna, cilíndrico, base não ramificada, ereta, glabra, afila, ápice ramificado, suberosos, fendidos longitudinalmente, cerca de 10 m de altura e 15 cm de diâmetro. Ramos patentes, afilos, cilíndricos, suberosos, com muitas cicatrizes, acinzentado-pardacento; os jovens cilíndricos, estriados, verdes, folhosos, com ápice florífero, sem estípulas. Folhas decíduas, coriáceas, simples, esparsas ou concentradas, fasciculadas, sésseis, base livre, desenvolvida de modo a se afastar do ramo, oblongas, inteiras, margem inteira, ápice obtuso a sub-retuso, do meio à base atenuada, abas as faces glabras, face adaxial verde escura, com nervura mediana na altura do limbo e dilatada na base, face abaxial verde e glauca com nervura mediana saliente esverdeada, nervuras secundárias delgadas, paralelas, abertas, com até cinco plegadas de comprimento e 0,5 pol de largura. Inflorescências terminais racemosas. Racemos breves, não maiores que as folhas em comprimento, paucifloros, aglomerados, não ramificados. Raque cilíndrica, pubérula. Pedúnculos cilíndricos, patentes, unifloros, de base articulada, pubescentes e bracteados. Brácteas acima da base dos pedúnculos, duas, opostas, caducas. Cálice ínfero, decíduo, simples, 5-mero, desigual, menor que a corola, coriáceo, sépalas ovais, inteiras, duas mais externas menores, pubérulas e com margem ciliada. Corola simples, regular, rosácea, 5-mera, ínfera, seca (mas não cai prontamente). Pétalas unguiculadas, sub-rotundas-elípticas, ápice desigual, retuso-oblíquo, coriáceas, róseas, divergentes, com a face interna glabra e nervuras radiadas, face externa amarelado-pubérula, uma pol de comprimento, 0,75 pol de largura. Estames ínferos, numerosos, de comprimentos desiguais, menores que as pétalas, os mais externos ereto-patentes e os mais internos eretos, próximos. Filetes livres, “férteis”, distintos, tênues, filiformes, glabros, verde-amarelados. Anteras oblongas, lineares, eretas, base cordada, ápice retuso, biloculares, abertura por fenda longitudinal, amarelas. Pistilo: ovário súpero, oval-trígono, glabro, simples, decíduo. Estilete cilíndrico, ereto, subtrígono, ápice espessado, glabro, não ramificado, decíduo. Estigma terminal, 3-partido, lobos cilíndricos, ápice capitado, um tanto côncavo.



Figura 3: Ilustração de *K. oblonga* apresentada na obra "Plantarum Brasiliae" por Pohl (1830).

## 2 – *K. microphylla* Pohl (Figura 4)

*Kielmeyera*: caule arbóreo, ramificado; folhas sésseis aglomerada, oblongo-elípticas, glabras; inflorescências racemosas; pedúnculos com menos de duas flores, sépalas ovais, pubérulas.

---

Ocorrência: Goiás.

Tronco arbóreo, lignificado, com medula interna, cilíndrico, base não ramificada, ereta, suberosa, rimosa, ápice ramificado, 8 pés de altura e 10 cm de diâmetro, Ramos dicotômicos, distantes e abertos, cilíndricos, suberosos, com muitas folhas ou cicatrizes foliares, esverdeado-acinzentado, os jovens cilíndricos, verdes, folhosos, floríferos e sem estípulas. Folhas dos ramos decíduas, coriáceas, simples, alternas, aglomeradas, fasciculadas, sésseis, base livre, aberta ou divergente, oblongo-elípticas, inteiras, ápice subobtusado, base quase estreitada (provavelmente o autor não conseguiu definir o formato), ambas as faces glabras, a superior verde escura com nervura central plana, a inferior verde mais escura com nervura central proeminente e glaucescente, nervuras secundárias subparalelas, com percurso aberto, 2,75 pol de comprimento, 0,75 pol de largura. Inflorescência terminal, racemosa. Racemos muito curtos, mal atingindo o comprimento da folha, multifloros, laxos, compostos, comprimidos. Raques cilíndricas, acinzentado-avermelhadas, glabra, não muito ramificada. Pedúnculo cilíndrico, patente, sub-bifloro (provavelmente existe a cicatriz e é visível o aborto de uma das flores), base articulada. Pedicelo cilíndrico, patente, bracteado. Brácteas opostas, caducas, subovadas, obtusas, glabras, margem sob lente ciliada. Cálice ínfero, decíduo, simples, 5-mero, regular, menor que a corola, acinzentado-avermelhado, coriáceo, pubérulo, sépalas ovadas, coriáceas, sob lente ciliadas, as duas mais externas menores. Corola simples, regular, igual, 5-mera, rosácea, ínfera, seca na planta e não cai ou demora a cair, pétalas unguiculadas, obovadas, de laterais desiguais, ápice retuso, margem coriácea, divergentes, róseas, glabras, com nervuras radiadas, 0,75 polegada de comprimento e 5 linhas de largura. Estames íferos, numerosos, de comprimentos diferentes, mais curtos que as pétalas. Filetes livres, férteis, distintos, tênues, filiformes, glabros, verde-amarelados, os mais externos ereto-patentes e os internos eretos, próximos. Anteras oblongas, eretas, biloculares, abertura por fendas longitudinais, amarelas. Pistilo: ovário súpero, ovado-trígono, glabro, 3-locular. Estilete mais longo que

os estames, cilíndrico, ereto, ápice espessado, glabro, não ramificado, decíduo. Estigma terminal, 3-partido, lobos cilíndricos, ápice capitado e com pequenas reentrâncias (parecido com bolinha de golfe).



Figura 4: Ilustração de *K. microphylla* apresentada na obra "Plantarum Brasiliae" por Pohl.

#### 1.4. Wawra e a primeira menção a variedades para *K. coriacea*

##### 1 – *K. coriacea*

Mart: Arbusto pequeno, ramos muito esparsos, tortuosos e decorticantes, ou finos e eretos; folhas concentradas no ápice dos ramos, coriáceas, frequentemente muito rígidas, raríssimo submembranáceas, subsésseis, obovadas a cuneado-oblongas, opacas, nervura central larga, minutamente e agregadamente peninérvea; panícula contraída, com poucas flores, tricomas ferrugíneos, raro sem tricomas; inflorescências várias vezes unissexuadas.

---

Ramos abreviados, secretores de resina, com a espessura de um dedo, córtex suberoso amarelado com cicatrizes das folhas que caíram raramente cobertas; ramos mais espessados na parte inferior. Folha 10 a 20 cm de comprimento, 3-10 cm de largura; sésseis ou pecíolo brevíssimo e muito dilatado raro (var. *α oblonga*) sutilmente sustentado, arredondada, retusa ou subaguda, base sempre aguda, quando jovens bem verdes, velhas frequentemente amareladas e bem coriáceas, quase suberosas e enrugadas, sem nervuras ou dispersamente reticuladas, nem muito nem pouco peninérveas, nervura mediana achatada; nervuras secundárias aglomeradas e frequentemente nervuras entre elas mais aglomeradas, paralelas e muito espalhadas, proeminentes nas duas faces. Panícula sempre terminal, brevemente estipitada, frequentemente muito contraída, raro laxa, geralmente com poucas flores e em várias espécies racemo pouco ramificado; ramos da raque comprimidos, geralmente espessos, longitudinalmente rugosos, a epiderme se soltando logo após anéis quase paleáceos (casca fina e seca parecido com descamante, papirácea), ápice com tricomas, brácteas caducas, no ápice sustenta, às vezes, folhas sem brilho. Pedúnculo 1-1,5 cm de comprimento, espesso, quadrangular, com duas brácteas no meio; brácteas do pedicelo quase do mesmo comprimento, ovado-lanceoladas, nervura mediana hirsuta; bractéola suboposta 0,5 cm de comprimento, margem externa calva (glabra) e ciliada, exceto hirsutíssima, muito raro na var. *β grandiflora* (glabra). Sépalas ca. 1 cm de comprimento, subdesiguais, ovado-oblongas ou com base alargada, subacuminadas, densamente pubérula, nas alas, maior parte glabra. Pétalas 2-4 cm de comprimento, lados desiguais, ovado-espauladas, com uma unha muito evidente; nos dois lados hirto-pubérula ou subglabra, alva ou avermelhada. Estames 2-3 vezes menores que as pétalas; anteras lineares, tecas quase laterais, recurvadas, alongadas, conectivo alargado, amarronzado,

com glândula na antera e pequenos tricomas conspícuos nessa região. Pistilo do mesmo tamanho dos estames, ovário ovóide e estilete quase que clavado no ápice e ruguloso, estigma piramidal com depressões, trilobado, antes da antese elipsóide e superfície crenulada. Cápsula (segundo Pohl) oblonga, elíptica, rotunda, ápice e base obtusos, retusos, rugosos, lignificados. Sementes sub-rotundas e elípticas, ala aproximadamente oblonga elíptica circundando toda a semente.

#### 1.1 – var. *typica*

Ramos grossos, tortuosos, recobertos por córtex suberoso; folhas amplas frequentemente bem largas, geralmente rigidamente coriáceas

Distribuição: Minas Gerais, Goiás e São Paulo

#### 1.2 – var. *α oblonga*

Ramos grossos, retos, raramente decorticantes, quase lisos; folhas menos coriáceas, cuneado-oblongas; pétalas avermelhadas (Pohl); estilete alongado.

Distribuição: Minas Gerais e Goiás

#### 1.3 – var. *β grandiflora* (Figura 5)

Ramos muito espessos, com terminações cônicas, obtuso terminal, córtex suberoso, mas não evidenciando as cicatrizes de folhas aglomeradas; folhas lisas obovadas, com alguns decímetros de comprimento; panícula terminal ramificada na base (quase formando várias panículas fasciculadas), floribunda, glabra, ramos muito comprimidos; cálice e corola subglabros; pétalas assim como na forma *typica*, delicadas.



KIELMEYERA I. corymbosa var.  $\alpha$ , II. coriacea var.  $\beta$ .

Figura 5: Ilustração de *K. coriacea* var.  $\beta$  *grandiflora* apresentada na obra *Flora Brasiliensis* por Wawra (1986).

## 2 – *K. microphylla*

Pohl: arvoreta, ramos espessos, com ramificação aberta, folhas quase membranáceas, ca. 8 cm de comprimento, lanceoladas, base geralmente aguda (decorrente), sésseis, opacas, glabras, enérveas, inflorescência com flores avermelhadas, dispostas em panículas paucifloras; pétalas hirsutas, anteras (glabras) uniformemente onduladas, com glândulas.

---

Tronco arbóreo, lignificado, 2,5 m de altura e 10 cm de largura ápice ramificado (Pohl). Ramos abreviados, formando ângulos abertos, dicotômicos e mais espessados na parte inferior, córtex amarelado, transversalmente rugoso, acima das folhas que caíram há cicatrizes nodosas, ápice foliáceo; medula rígida, lenho frágil. Folha 7 cm de comprimento, 2 cm de largura, submembranácea (talvez o autor tenha tentado supor que as folhas fiquem mais rígidas com o tempo), base obtusa ou aguda com pecíolo muito curto, gradualmente atenuada ou plana e folha séssil, quando seca verde escura, opaca, enérvea, nervura central alva e rugosa ao longo do limbo; nervuras secundárias sutilíssimas, conspícuas sob lente, alternadamente visíveis ou não. Panícula pouquíssimo ramificada, subracemosa, contraída, oliganta, breve-estipitada; eixo da raque: pedúnculo rugoso e angular, com poucos tricomas curtos; pedúnculo ca. 1 cm de comprimento, estreito e com ápice mais grosso, bráctea oblonga, rotunda, marrom escuro e caduca; cheia de cicatrizes das brácteas opostas acima da base (bractéolas, glabras, margem levemente ciliada; Pohl). Sépalas com 5 mm de comprimento, não muito desiguais, ovadas, ovadas, obtusas, sub-herbáceas, exteriores principalmente com tricomas ferrugíneos, margem não totalmente macia. Pétalas 1,5 cm de comprimento, carnosas, subdesiguais lateralmente, muito obovadas, metade superior externa e internamente pubérrulas, metade inferior subglabra e com nervuras visíveis. Estames do tamanho de metade das pétalas, pistilo também; antera oblonga, frequentemente fendida e recurvada, tecas alongadas, tecas alongadas, amareladas, conectivo largo, marrom escuro, glândula que é levemente súpera e pouco desenvolvida. Ovário ovóideo-trígono, estames estriados, estilete quase mais longo que o ovário 3-sulcado, ápice dificilmente espessado; estigma vestigial, cônico e trilobado.

### 3 – *K. tomentosa*

Cambess.: ramos espessados, muito próximos, rugosos; folhas sésseis, coriáceas, quase que 22,5 cm de comprimento, base cuneada, obovada ou oblonga, aglomeradas, peninérveas, na face abaxial nervura reticulada e ala formada pela nervura levemente tomentosa; inflorescência disposta em um racemo estipitado curto, raques transversas rugulosas, pedúnculo espesso; anteras lineares e com glândulas; estilete clavado, ovário quase igual em tamanho, comprimento.

---

Arbusto; ramos mais espessados na parte inferior, medula farta e dura, quando angulosa, parte superior do pedúnculo do racemo e da raque transversalmente rugulosos, quase paleáceos, cobertos por um córtex amarelado, glabro. Folhas espaçadas ou aglomeradas, 14 cm de comprimento e 5 cm de largura, pecíolo brevíssimo, atenuado, circular, frequentemente retusa, pálida, opaca, nervura mediana impressa na face adaxial e elevada na abaxial, nervuras secundárias ca. 5 mm de distancia entre si, distantes (abertas), paralelas, indivisas, nervuras precisamente ramificadas entre si. Racemos, às vezes, corimbiformes, dificilmente mais longos que 5 cm, estipe do mesmo comprimento, pedúnculo da raque denso a parcialmente coberto por tricomas ferrugíneos-hirtelos ou totalmente glabro, pedúnculo 2-1 cm de comprimento, anguloso, sustentado por brácteas externas lanceoladas, hirsutas; bractéolas perto do botão, alternas, 5 cm de comprimento, circulares, também caducas (com brácteas). Sépalas subiguais, 7 mm de comprimento, ovadas, circulares ou subagudas (as mais internas), margem com cílios (glabra no resto). Pétalas com 2 cm de comprimento, oblíquas obovadas, delicadas, alvas. Estames com metade do comprimento das pétalas, anteras lineares, emarginadas nos dois lados, a abertura dos lóculos se estreita após a liberação dos grupos de pólen, conectivo dorsalmente alargado. Ovário ovoide, trígono, rugoso; estilete: base estreitamente clavada, rugosa, 3-sulcada, sulcos dobrados como um joelho (na base) (fruto apresenta uma elevação entre as valvas); estigma obtuso, cônico, 3-lobado.

Distribuição: Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro.

**Anexo 2** – Protocolo utilizado para extração de DNA genômico em *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. e *K. grandiflora* (Wawra) Saddi (baseado em Doyle & Doyle 1987 e modificado por Caddah 2009).

**Solução CTAB (10 ml):**

H<sub>2</sub>O MilliQ 5,78 mL

Tris HCl (1M, pH 7,5) 1 mL

NaCl (5M) 2,7 mL

EDTA (0,5M, pH 8,0) 400 µL

PVP (Polivinil Pirrolidona) 40 0,1 g

CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) 0,2 g

BME (2-mercaptoetanol) (14M) 20 µL

Para a dissolução do CTAB e do PVP, aquecer previamente a solução a 65°C; acrescentar BME por último.

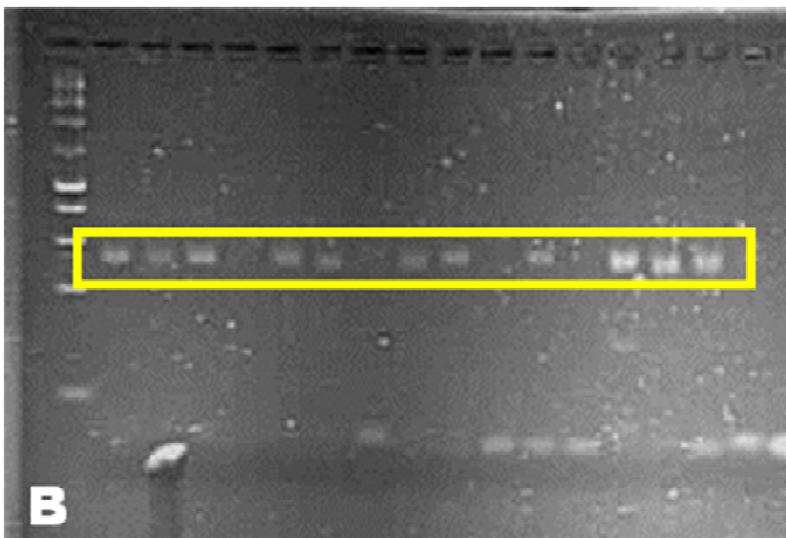
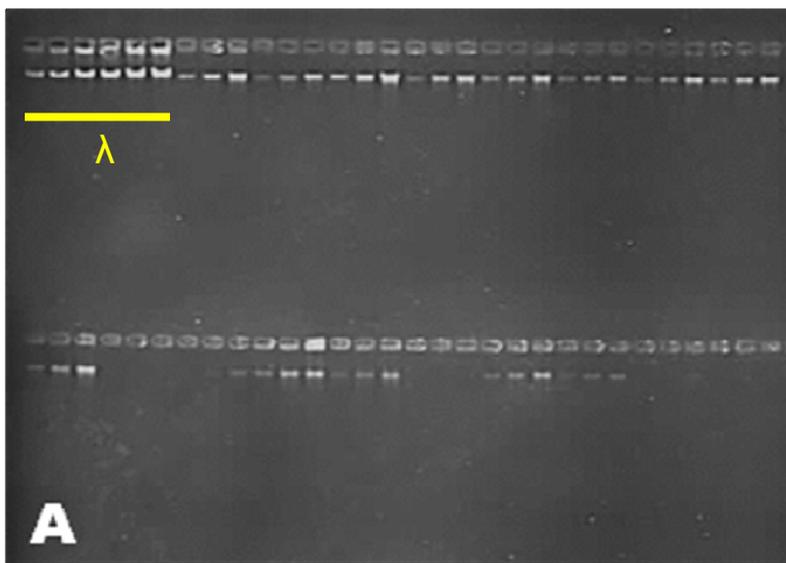
Importante: para que a extração seja realizada com sucesso é aconselhado que a solução CTAB não seja estocada por muito tempo, além disso, ela nunca deve ser estocada após a adição de BME.

**Extração:**

1. Colocar 50 mg de folha moída em *ependorf* de 2 mL;
2. Adicionar 800 µL da solução CTAB;
3. Incubar à 65°C por 1 hora, agitando por inversão a cada 10 minutos;
4. Deixar à temperatura ambiente por 5 minutos;
5. Adicionar 800 µL de SEVAG (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico), de preferência gelado;
6. Misturar delicadamente por inversão por 1 minuto;
7. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
8. Transferir a fase aquosa para um *ependorf* limpo de 1,5 mL;
9. Adicionai mais 800 µL de SEVAG (24 Clorofórmio: 1 Álcool isoamílico);
10. Misturar delicadamente por inversão por 5 minutos;
11. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
12. Transferir a fase aquosa para um *ependorf* limpo de 1,5 mL;
13. Adicionar 300 µL de Isopropanol;

14. Misturar delicadamente por inversão por 1 minuto;
15. Armazenar a -20°C por 1-24 horas;
16. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
17. Descartar delicadamente o sobrenadante;
18. Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado;
19. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos;
20. Descartar o sobrenadante;
21. Secar internamente o tudo (delicadamente com papel absorvente, porém nunca encostando o papel no DNA, ou deixando descansar a temperatura ambiente ou em câmara de fluxo por algumas horas);
22. Adicionar 1 µL de RNase (10 mg/ml);
23. Deixar o tubo agitando por pelo menos 1-2 horas;
24. Estocar em *freezer* (se for por muito tempo) ou geladeira (caso vá usar nos próximos dias).

**Anexo 3** – A. Gel de Quantificação de DNA (agarose 1%) com os 6 primeiros poços correspondendo ao marcador ( $\lambda$ ) nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ng/ $\mu$ L, respectivamente. Os indivíduos foram quantificados em triplicata, sendo o primeiro poço de cada referente à metade da concentração real, o segundo à concentração real e o terceiro com duas vezes a concentração real. B. Gel de PCR (agarose 3%), com o marcador 10 kb Plus no lado esquerdo da imagem (utilizado para verificar se houve amplificação dos produtos desejados) e região de amplificação destacada no retângulo amarelo.



**Anexo 4** – Gel de poliacrilamida 6% do *primer 7*, com os indivíduos numerados em verde e o marcador (10 pb) em vermelho, utilizado para genotipagem dos indivíduos. Na parte inferior da figura há um detalhe de uma região do gel.

