

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



LIDYANNE YURIKO SALEME AONA

CARACTERIZAÇÃO E DELIMITAÇÃO DO GÊNERO *MICRANTHOCEREUS*
BACKEB. (CACTACEAE) BASEADAS EM CARACTERES MORFOLÓGICOS E
MOLECULARES.

200333901

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA DO CARMO E. AMARAL

CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. DANIELA C. ZAPPI

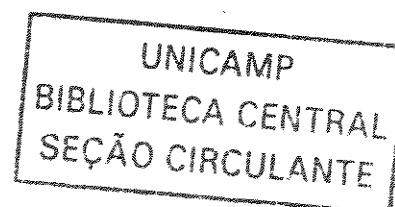
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lidyanne YuriKo Saleme Aona
e aprovada pela Comissão Julgadora.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE BIOLOGIA PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA
VEGETAL.

Maria do Carmo E. Amaral

CAMPINAS-SP

2003



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	A56c
V	EX
TOMBO BCI	56395
PROC.	16-123403
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CND00192018-7

Bib id 305149

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

AONA, LIDYANNE YURIKO SALEME

A56c

A056c

Caracterização e delimitação do gênero *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) baseadas em caracteres morfológicos e moleculares/Lidyanne Yuriko Saleme Aona. --
Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientadora: Maria do Carmo E. Amaral
Co-orientadora: Daniela C. Zappi
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1. *Micranthocereus* Backeb. 2. Cactaceae. I. Amaral, Maria do Carmo E. II. Zappi, Daniela C. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA

Data da Defesa: 10/03/2003.

Profa. Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral

Maria do Carmo Estanislau do Amaral

Prof. Dr. João Semir

João Semir

Profa. Dra. Julie H. Antoniette Dutilh

Julie H. A. Dutilh

Prof. Dr. Vidal de Freitas Mansano

AGRADECIMENTOS

Este trabalho, assim como meu (pouco) conhecimento botânico, foi profundamente influenciado e somente possível pelo apoio incondicional da Profa. Maria do Carmo E. do Amaral, que me deu oportunidade de ser sua aluna desde a época da graduação, em 1995 (tudo começou aí !). Um obrigada especial a Maria do Carmo pela sua capacidade de realizar sonhos. Obrigada também pela paciência, confiança, amizade e ajuda nas horas mais difíceis. A elaboração do projeto de tese não seria possível sem a ajuda de Daniela C. Zappi, Nigel P. Taylor, pesquisadores do Royal Botanical Gardens, Kew e Volker Bittrich. Obrigada aos três pela leitura crítica e pelas valiosas sugestões que muito enriqueceram o trabalho. Gostaria de agradecer em especial a Volker Bittrich, pelas inúmeras conversas e sugestões, pelo cuidado com os cactos da casa de vegetação, por toda atenção em vários momentos deste projeto e pela pré-banca informal. Obrigada também a Daniela C. Zappi, pela co-orientação, por me 'apresentar' a uma família tão fascinante, pelas inúmeras dicas, pelo material bibliográfico e pelo sorriso tão carismático.

Obrigada aos membros da banca João Semir, Julie H. Antoinette Dutilh e Vidal F. Mansano pelas preciosas sugestões que muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho. A realização deste trabalho se tornou possível devido aos financiamentos fornecido pela FAPESP, através da bolsa de estudo e FAEP, através de financiamento parcial dos estudos moleculares. Agradeço também a Sub-comissão do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal através da Profa. Ana Tozzi e ao Departamento de Botânica através da Profa. Kikyo Yamamoto pela oportunidade oferecida para realização de grande parte desta tese.

Vários colegas, amigos, professores, e técnicos ajudaram diretamente na realização desta tese, durante viagens de coleta, cuidando dos cactos na casa de vegetação, em tarefas no laboratório, fornecendo indivíduos, nas conversas (às vezes desesperadas) sobre o trabalho e na convivência dentro e fora do Depto. de Botânica: 'Aninha', Ana Paula Gonçalves, André Simões, Andréia Spina, Andréia Barbosa, Andréia Flores, Cibele Cardoso, Cida, Christiano Verola, Edileide, Eduardo Borba, Emerson Pansarin, Fabiano Farah, Fabiano Micheletto, Fábio Vitta, Fabíola, George Shepherd, Iara, Ingrid Kock, Itayguara, João Carlos Galvão, João Semir, Jorge Tamashiro, Karin dos Santos, Kazue Matsumoto, Liana, Leonardo Meireles, Ludmila Mickeliunas, Maria Fernanda, Maria Lúcia, Mariana Mansanares, Marília Moraes, Marlies Sazima, Marta Moraes, Michele Dechoum, Renato Belinello, Rodrigo Schültz, Samantha, Tehra, 'Tião' Militão, Vidal Mansano, José Eduardo, 'Dona' Zulmira, Wilson (Bio); muito obrigada a todos.

Agradeço também algumas pessoas que foram especiais durante esses anos convívio na Botânica. Obrigada ao Prof. João Semir, por sempre prestar atenção nas minhas questões bobas e pela simpatia contagiante, a Cida pelas inúmeras conversas, dicas, ajudas (e conselhos!) e pela amizade sempre agradável, ao Emerson pelas conversas, pela enorme ajuda no trabalho de polinização de *Micranthocereus* e pelo convívio prazeroso, a Mariana e Luís Pedro por serem meus 'irmãzinhos', ao Leonardo Meireles e ao Christiano Verola pelas 'noitadas' na Botânica, pelos inúmeros cachorros-quentes e pelas risadas gostosas. Um obrigada especial a Carla, Gerson, Morgana e João Pedro, minha segunda família aqui em Campinas e a Viviane Fais, Juliana Félix, Patrícia Santarosa e Frederico Pierri (e ao restante da turma 94N) pela amizade sempre presente. Agradeço também ao Marlon Machado pelas inúmeras dicas sobre os *Micranthocereus*.

Obrigada as demais pessoas que com certeza esqueci de citar !

Gostaria de agradecer a equipe da Profa. Anete Pereira de Souza (pesquisadora do Centro de Biologia Molecular e engenharia Genética da UNICAMP) pela paciência e atenção no aprendizado de técnicas moleculares.

Mais uma vez agradeço a todos os professores, colegas e técnicos com quem tenho convivido nestes últimos 9 anos desde o meu começo no Depto de Botânica. Obrigada pela ajuda em vários momentos.

Por último, mas sempre em primeiro lugar, agradeço à minha família (principalmente a 'Dona Pepenha' e o 'seu Masashi', meus queridos pais) pelo carinho e atenção constantes (mesmo nos piores momentos), por sempre transmitirem tranquilidade, alegria e otimismo, por respeitarem o que gosto de fazer e por acreditarem em mim. Um obrigada sem tamanho a vocês, que mesmo tão longe, estão sempre presentes em tudo o que faço. Amo muito vocês !

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
CAPÍTULO 1 - ESTUDO CLADÍSTICO DO GÊNERO <i>MICRANTHOCEREUS</i> BACKEB. (CACTACEAE)	22
CAPÍTULO 2 - POLLINATION BIOLOGY OF TWO BRAZILIAN ENDEMIC <i>MICRANTHOCEREUS</i> BACKEB. (CEREAE, CACTOIDEAE) SPECIES	91
CONCLUSÕES GERAIS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

APRESENTAÇÃO

- Figura 1.** Corte longitudinal de uma flor de *Micranthocereus streckeri* (L.Y.S.Aona *et al.* 810) mostrando partes florais importantes na taxonomia da família Cactaceae. Note que na base da flor, a aréola está coberta por espinhos e tricomas lanosos. Desenho: Rogério Lupo 11

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Mapa de distribuição das espécies pertencentes ao subg. *Micranthocereus*, endêmicas de Minas Gerais e Bahia. Entre estas espécies, *M. flaviflorus* (◇) é a que apresenta uma maior distribuição. As demais espécies apresentam distribuição restrita a apenas uma localidade 26

- Figura 2:** Mapa de distribuição das espécies pertencentes ao subg. *Austrocephalocereus* e ao subg. *Siccobaccatus*. *M. estevesii* (□) é a única espécie do gênero que ocorre fora da área geográfica típica das outras espécies 27

- Figura 3.** A e C: *M. flaviflorus* (A: L.Y.S. Aona 756 & R. Belinello, Cafarnaum, BA; C: M.C. Machado, s.n., Cafarnaum, BA). B e D: *M. violaciflorus* (L.Y.S. Aona 711 & R. Belinello, Grão Mogol, MG). E: *M. purpureus* (L.Y.S. Aona 755 & R. Belinello, Palmeiras, BA). F: *M. polyanthus* (L.Y.S. Aona 729 & R. Belinello, Caetité, BA). Subg. *Austrocephalocereus*: B, D e E. Subg. *Micranthocereus*: A e F. (C: foto de Marlon C. Machado) 29

- Figura 4.** A e C: *M. streckeri* (L.Y.S. Aona 741 & R. Belinello, Seabra, BA). B: *M. albicephalus* (L.Y.S. Aona 722 & R. Belinello, Mato Verde, MG). D-E: *M. auriazureus* (L.Y.S. Aona 690 & R. Belinello, Grão Mogol, MG). F: *M. dolichospermaticus* (L.Y.S. Aona 734 & R. Belinello, Porto Velho, BA) G: *M. estevesii* (L.Y.S. Aona *et al.* 840, Nova Roma, GO). Subg. *Micranthocereus*: A, C, D e E. Subg. *Austrocephalocereus*: B. Subg. *Siccobaccatus*: F e G 31

Figura 5: (A) *Coleocephalocereus fluminensis* (E.L. Borba s.n., Juiz de Fora, MG). (B e E) *Coleocephalocereus goebelianus* (B: L.Y.S. Aona 724 & R. Belinello, Espinosa, BA, E: L.Y.S. Aona 769 & R. Belinello, Tanhuaçu, BA). (C) *Melocactus conoideus* (L.Y.S. Aona s.n. & R. Belinello, Vitória da Conquista, BA). (D) *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* (L.Y.S. Aona et al. 817, Cafarnaum, BA)

35

Figura 6. Espinhos hipertróficos na base do caule em indivíduos adultos de *M. dolichospermaticus* (A) e em indivíduos jovens de *M. auriazureus* (B). Corte transversal do cefálio de tipo superficial em *M. polyanthus* (C), superficial a aprofundado em *M. streckeri* (D) e aprofundado em *M. dolichospermaticus* (E) e *M. albicephalus* (F)

45

Figura 7: (A) Fruto deiscente de *Micranthocereus auriazureus*, note a polpa funicular de coloração branca. (B) Frutos de *M. purpureus* mostrando formas que variam de globosos a depresso-obovais, note os restos florais acastanhados. (C) Flor de *M. estevesii*, note os segmentos do perianto externo reflexos durante a antese. (D) Fruto de *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, note a polpa funicular vinácea. (E) Semente de *M. dolichospermaticus*, note a coloração marrom e o formato alongado. (F) Semente de *M. streckeri*, note a coloração negra e o formato suborbicular, constante nas demais espécies de *Micranthocereus*

51

Figura 8. Sementes. (A-B) *M. violaciflorus*. (A) vista geral do formato suborbicular (escala: 100µm), (B) células tectais evidenciando crateras entre essas células e superfície finamente estriada (escala: 10µm). (C) *M. estevesii*. Células da testa isodiamétricas (escala: 10µm). (D) *M. purpureus*. Células da testa fracamente convexas evidenciando crateras entre essas células e superfície finamente estriada (escala: 10µm). (E) *M. streckeri*. Células da testa fracamente convexas evidenciando ausência das crateras entre essas células (escala: 10µm). (F) *M. polyanthus*. Superfície celular da testa lisa, sem crateras, paredes periclinais planas (escala: 10µm). (G-H) *M. dolichospermaticus*. (G) formato alongado da semente (escala: 100µm), (H) detalhe das paredes periclinais das células da testa fracamente convexas, superfície lisa, sem crateras (escala: 10µm). (I) *Coleocephalocereus goebelianus*. Detalhe das paredes periclinais fortemente convexas, superfície finamente estriada (escala: 10µm)

59

Figura 9: (A) Árvore mais parcimoniosa obtida a partir das análise de dados morfológicos, com os dados mapeados nos respectivos ramos. O subg. *Siccobaccatus* está em destaque no cladograma. (B) Árvores de 'bootstrap'. Apenas valores de bootstrap superiores a 50% foram apresentados..... 65

Figura 10: (A) Árvore de consenso estrito obtida a partir da análise de *trnL-F*. Apenas valores de bootstrap superiores a 50% foram apresentados. (B) Uma das árvores mais parcimoniosas obtida a partir da análise 'branch and bound' com dados de *trnL-F* 67

Figura 11: Filograma obtido a partir da análise de *trnL-F* mostrando o comprimento dos ramos, indicando o alto grau de autapomorfia nos taxa estudados 68

Figura 12: Árvore de consenso estrito obtida a partir de dados de *trnL-F* utilizando-se *Austrocactus bertinii* como grupo externo. da análise combinada de dados. (B) Árvore de 'bootstrap' obtida a partir de dados combinados. Foram representados valores de 'bootstrap' superiores a 50% 70

CAPÍTULO 2

Figure 1. Flowers and floral visitors of *Micranthocereus flaviflorus* and *M. streckeri* in NE Brazil. (A-B) *Chlorostilbon aureoventris* and *Phoebastria phila* on flowers of *M. flaviflorus*, respectively. (C-D) *Chlorostilbon aureoventris* on flower of *M. streckeri*; note the presence of pollen grains on the bill of the hummingbird (D). (E-F) *Phaethornis squalidus* and a *Hesperidae* species on flowers of *M. streckeri*, respectively 107

Figure 2. Longitudinal section of flowers of *Micranthocereus flaviflorus* (A) and *M. streckeri* (B). Note the nectar chamber (arrow) 109

Figure 3. Frequency of visiting bouts of *Micranthocereus flaviflorus* and *M. streckeri* pollinators in NE Brazil. A. Males of *Clorostilbon aureoventris* on flowers of *M. flaviflorus*. B. *Phaethornis squalidus* (hatched bars) and male of *C. aureoventris* (white bars) on *M. streckeri* flowers 111

Figure 4. Flower length and diameter (mm) of *Micranthocereus flaviflorus* (Mf) e *M. streckeri* (Ms) in NE Brazil. Bars: standard deviations 112

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Amostras utilizadas para obtenção dos caracteres moleculares	37
Tabela 2. Caracteres morfo-anatômicos e respectiva polarização	40
Tabela 3. Matriz de dados morfológicos. (?) = dados não conhecidos. Todos os caracteres são tratados como 'não ordenados'	42
Tabela 4. Valores e análises estatísticas realizadas a partir do programa PAUP de caracteres morfológicos e moleculares separados e combinados	62

CAPÍTULO 2

Tabel 1. Comparison of nectar volume (μ l) and concentration (% of sugars) of <i>Micranthocereus flaviflorus</i> and <i>M. streckeri</i> flowers in NE Brazil. (n): number of flowers	113
---	-----

ÍNDICE DE APÊNDICES

CAPÍTULO 1

Apêndice 1. Protocolo para extração e precipitação do DNA, segundo kit extração Nucleon Phytopure	82
Apêndice 2. Protocolo utilizado no presente estudo para amplificação da região do espaçador intergênico <i>trnL-F</i>	85
Apêndice 3. Protocolo utilizado no presente estudo para purificação dos produtos de PCR	87
Apêndice 4. Chave analítica para identificação das espécies de <i>Micranthocereus</i> baseada em Taylor (2000), modificada	88

RESUMO

O gênero *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) é endêmico do Brasil e inclui nove espécies distribuídas nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Goiás e Tocantins. Os objetivos do presente estudo foram investigar o monofiletismo do gênero *Micranthocereus* com base em caracteres morfológicos e macromoleculares; determinar as relações filogenéticas entre as espécies do gênero em questão com gêneros próximos dentro da tribo Cereeae, visando investigar sua posição dentro da tribo; e reavaliar caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados para delimitar taxa dentro da tribo Cereeae. Foram investigados caracteres morfológicos e macromoleculares a partir do seqüenciamento da região *trnL-F* do DNA de cloroplasto para 10 táxons representando quatro gêneros, incluindo também *Cereus*, *Pilosocereus*, *Coleocephalocereus* e *Melocactus*. Uma espécie de *Cereus* foi incluída como grupo externo na análise cladística baseada em caracteres macromoleculares e uma espécie de *Pilosocereus* para análise morfológica. As matrizes foram analisadas sob o critério de parcimônia. Os resultados obtidos não confirmam o monofiletismo do gênero *Micranthocereus*, que é indicado pela constante inclusão de *Coleocephalocereus* dentro de *Micranthocereus*. Os clados não são fortemente sustentados na análise de 'bootstrap' e a extrema variação de caracteres morfológicos encontrada dentro do gênero demonstra a dificuldade na sua delimitação e no seu posicionamento dentro da tribo Cereeae, impossibilitando no momento, qualquer mudança taxonômica para o gênero. Foi também investigada a biologia floral de duas espécies endêmicas da Bahia, *Micranthocereus streckeri* e *Micranthocereus flaviflorus*. As flores das duas espécies têm coloração rósea (*M. flaviflorus*) a rósea intenso (*M. streckeri*) e apresentam antese diurna, com duração de cerca de 36 horas. O néctar é produzido e armazenado na câmara nectarífera, localizada no interior do tubo floral e a concentração de açúcares varia

de 18 a 24%. Ambas as espécies apresentam características típicas de flores polinizadas por aves e são visitadas e polinizadas pela mesma espécie de beija-flor, *Clorostilbon aureoventris*.

ABSTRACT

Micranthocereus Backeb. is a genus of Cactaceae endemic to Brazil and includes nine species distributed in the states of Minas Gerais, Bahia, Goiás and Tocantins. The goals of the present study were to investigate the monophyly of the genus based on morphological and macromolecular characters and its relationships to the members of the tribe Cereeae; to investigate the phylogenetic relationships between the species and to reevaluate the traditional morphological characters used to define taxa within the tribe Cereeae. The cladistics analysis was based on morphological characters and sedan sequence data (of the region *trnL-F* of the chloroplastid) for 10 taxa representing four genera, including *Cereus*, *Pilosocereus*, *Coleocephalocereus* and *Melocactus*. One species of *Cereus* was included as outgroup in the cladistic analysis based on macromolecular characters while a species of *Pilosocereus* was used as outgroup for the morphological analysis. The matrixes were analysed using the maximum parsimony criterium. The results do not confirm the monophyly of the genus *Micranthocereus* due to constant inclusion of *Coleocephalocereus* within *Micranthocereus*. The clades obtained, however, are not strongly supported by the bootstrap analysis. The extreme variation of morphological characters within the genus, impedes its delimitation and the classification of its position within tribe Cereeae. Therefore it is not possible to propose any taxonomic change to *Micranthocereus* based on the present studies. Floral biology of two endemic species from Bahia, *Micranthocereus streckeri* and *Micranthocereus flaviflorus*, was also investigated. The flowers of these species vary from pinkish (*M. flaviflorus*) to deep pink (*M. streckeri*), their anthesis occurs during daytime, and each flower lasts around 36 hours. The nectar is produced and stored in the nectar chamber within the floral tube, and the sugar concentration varies

between 18 and 24%. Both species present typical characters associated with bird pollinated flowers and are visited and pollinated by the same species of hummingbird, *Clorostilbon aureoventris*.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Cactaceae Juss., com cerca de 100 gêneros e 1300 espécies (Cronquist 1981, Barthlott & Hunt 1993), tem distribuição quase exclusiva na América. Uma espécie de *Rhipsalis* Gaertn., que é difundida na América Tropical, também se estende a África, Madagascar e Ceilão, e várias espécies de *Opuntia* Mill. são amplamente naturalizadas em regiões quentes do Velho Mundo. Os principais centros de diversidade da família ocorrem em regiões áridas do sudoeste dos Estados Unidos e México e no Oeste da América do Sul (Taylor em Oldfield 1997). Segundo Taylor & Zappi (1989) e Taylor (em Oldfield 1997), as Cactaceae possuem seu terceiro centro de diversidade na parte oriental do Brasil. Devido ao interesse na horticultura, muitas espécies têm sido propostas: Barthlott & Hunt (1993) mencionam a existência de 12000 binômios, e esse número está atualmente próximo a 13000 (N. Taylor, com. pess.). A classificação da família está baseada em trabalhos recentes feitos em reuniões da 'International Organization for Succulent Plant Study' (Hunt & Taylor 1986, 1990, Hunt 1999, Taylor 2000).

A família Cactaceae apresenta os seguintes caracteres morfológicos: (1) presença de aréolas (ramos axilares altamente reduzidos, recobertos por tricomas e situados na base da face adaxial de uma folha persistente ou decídua, muitas vezes extremamente reduzida ou completamente ausente) que podem produzir espinhos, outros ramos, e também flores, (2) presença de ovário ínfero do tipo receptacular, recoberto por tecido caulinar e, portanto, dotado às vezes de brácteas e aréolas.

Devido a sua adaptação a ambientes xéricos, as Cactaceae são uma das mais interessantes famílias do ponto de vista anatômico e morfológico. Várias características anatômicas presentes na família como, por exemplo, aumento do parênquima aquífero (tecido de reserva de água), cutícula espessa e presença de

uma hipoderme são adaptações xeromórficas bem conhecidas (Salgado & Mauseth 2002). Dentre as características morfológicas de *Micranthocereus*, alguns caracteres merecem ser comentados, pois apresentam considerável variabilidade, sendo, a maioria deles, importantes caracteres diagnósticos para os gêneros e as espécies.

A seguir, serão definidos termos tradicionalmente usados na taxonomia das Cactaceae de modo geral, como costelas, aréola, cefálio e pericarpelo:

COSTELAS: a maioria das Cactaceae colunares possui projeções verticais chamadas costelas, que podem dar um maior suporte a uma certa altura da planta e também são capazes de se adaptarem à disponibilidade de água, contraindo-se ou expandindo-se (Gibson & Nobel 1986, Barthlott & Hunt 1993). Uma outra possível adaptação das costelas seria a de aumentar a superfície fotossintética da planta (Gibson & Nobel 1986). Cactaceae globulares também possuem costelas, porém elas são mais discretas, às vezes em arranjos espiralados (Gibson & Nobel 1986). Segundo Barthlott & Hunt (1993), o número de costelas pode variar de dois, como nos caules achatados de cactos epífitos, a mais de 100 como em gêneros globulares multicostados.

ARÉOLAS: são ramos axilares (blaquiblastos) que estão situados na base da face adaxial de uma folha persistente, decídua ou extremamente reduzida, com capacidade de produzir espinhos (folhas modificadas), tricomas e dali originam-se novos ramos e botões florais. Uma aréola pode produzir outro ramo quando há estímulo, como por exemplo, após injúria, e também pode produzir flores. Em muitos taxa, aréolas floríferas estão restritas a porções particulares do caule (Barthlott & Hunt 1993, vide **cefálio**). Segundo Taylor (2000), aréolas são protuberâncias recobertas por tricomas que correspondem a ramos altamente reduzidos, encontradas em várias partes da planta. As aréolas de todos os gêneros

da família Cactaceae produzem um indumento persistente de tricomas multicelulares unisseriados e freqüentemente espinhos, sendo raro encontrar folhas desenvolvidas juntamente com os espinhos (Barthlott & Hunt 1993). Os espinhos estão presentes em todos os gêneros, pelo menos nos primeiros estágios de desenvolvimento.

CEFÁLIO: segundo Barthlott & Hunt (1993), quando a zona fértil ou florífera do caule é conspicuamente modificada e delimitada, o termo usado para defini-la é cefálio. No entanto, há muitas definições de cefálio na literatura. Segundo Mauseth (1989), a ocorrência de numerosas aréolas floríferas modificadas concentradas em uma mesma região do ramo, em costelas contíguas, forma o chamado pseudo-cefálio ou região florífera, e a imersão das aréolas floríferas no ramo, impedindo o processo de fotossíntese na região florífera é chamada de cefálio verdadeiro. Outros autores (Gibson & Nobel 1986) denominam como cefálio apenas aquelas estruturas terminais que cessam crescimento vegetativo das plantas, uma vez atingida a maturidade, como ocorre no gênero *Melocactus* Link & Otto. Zappi (1992) e Taylor (2000) definem cefálio como a porção do caule que, ao assumir a função reprodutiva, fica coberta de aréolas floríferas com muitos espinhos, cerdas e tricomas, perdendo a função vegetativa. O presente trabalho também utiliza essa definição. Estruturas chamadas 'cefalóides', como cefálio e pseudo-cefálio, são características da maioria das espécies da tribo Cereeae (Taylor & Zappi 1989). Uma das hipóteses sobre a origem/diferenciação do cefálio é de que ele tenha sido selecionado por proporcionar proteção e exposição das partes reprodutivas da planta e também por isolar as partes espinescentes do contato com asas ou outras estruturas de possíveis agentes polinizadores (Zappi 1992).

PERICARPELO E TUBO FLORAL: a formação de um ovário ínfero pode se dar através de dois modos. O modo mais comum é o de origem apendicular, onde as

estruturas externas das flores encontram-se fundidas ou conatas ao ovário. Um ovário ínfero também pode ser formado por “aprofundamento” ou imersão no receptáculo. Neste modelo de origem receptacular (Boke 1964), o ovário é coberto por tecido caulinar (receptacular) e não é envolvido pelos apêndices florais externos. Este modelo de origem receptacular explica porque o ovário de Cactaceae é coberto por brácteas (folhas) e aréolas (gemas axilares) em vários gêneros (Gibson & Nobel 1986). A parede externa do ovário das flores de Cactaceae, formada por tecido caulinar muitas vezes dotado de aréolas e brácteas escamiformes, foi chamada de pericarpelo por Buxbaum (1953), tendo este termo sido firmemente estabelecido através do trabalho de Gibson & Nobel (1986) e amplamente usado por Barthlott & Hunt (1993), Taylor (2000) e Zappi (1992). Quando presente, a região imediatamente acima do pericarpelo, e que se estende até o início dos segmentos do perianto, é denominado de ‘tubo floral’. Este termo corresponde ao hipanto envolvido por tecido receptacular e pode apresentar, às vezes, aréolas e tricomas.

A figura 1 ilustra uma flor de *Micranthocereus streckeri*, típica para a família Cactaceae. A região acima do ovário e do pericarpelo é chamada de tubo floral. Em alguns gêneros de Cactaceae, a parte externa do tubo floral é coberta por brácteas escamiformes (estruturas homólogas a folhas), ou a base do tubo floral e o pericarpelo podem estar inserida no caule, em uma aréola cobertas por espinhos e tricomas lanosos. Em *Micranthocereus*, o tubo floral e o pericarpelo são nus, podendo o tubo floral apresentar diminutas escamas no ápice. Em Cactaceae, as partes florais internas e externas (tépalas) formam uma série gradual e são chamadas respectivamente de segmentos externos e internos do perianto. Estes segmentos podem ser de coloração semelhante ou diferenciada, como ilustrado aqui em *Micranthocereus streckeri*, onde os segmentos internos do perianto são alvos

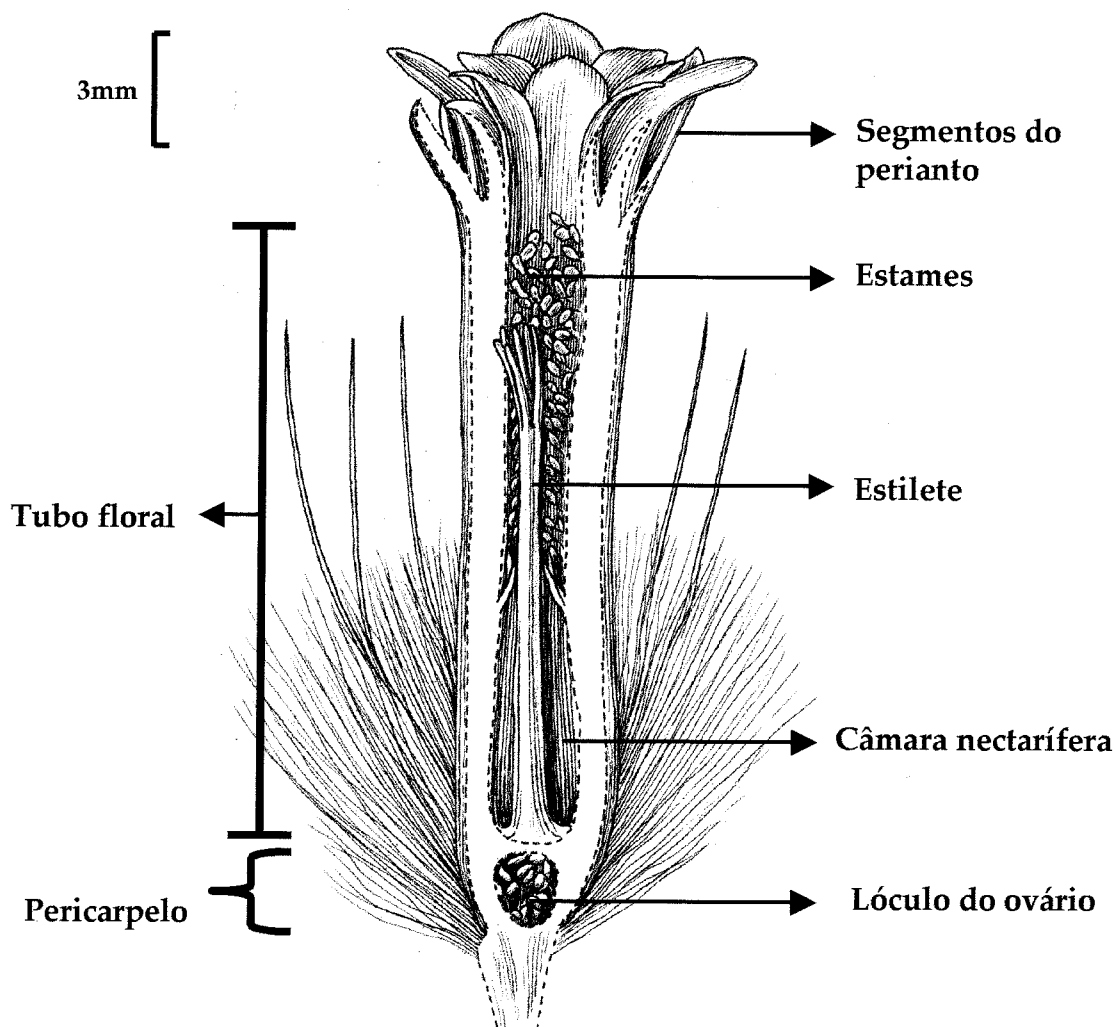


Figura 1. Corte longitudinal de uma flor de *Micranthocereus streckeri* (L.Y.S.Aona *et al.* 810) mostrando partes florais importantes na taxonomia da família Cactaceae. Note que na base da flor, a aréola está coberta por espinhos e tricomas lanosos. Desenho: Rogério Lupo.

e os segmentos externos do perianto são róseo-claros. Internamente ao tubo floral estão fixadas centenas de estames (em alguns casos muito especializados encontramos menos de 20 estames). Na base dos estames mais internos, o tubo floral forma uma câmara nectarífera que está protegida por um grupo de filetes geralmente estéreis e curtos, que se encontram voltados em direção ao estilete. No ápice do ovário surge o estilete que atravessa o tubo floral e passa pelo grupo de estames. Os estigmas geralmente são brancos e dividem-se em vários lobos filiformes. O ovário é unilocular com placentação geralmente hipantial ou raramente basal-laminar (Leins & Schwitalla 1988). A cavidade do ovário (lóculo) é preenchida com muitos óvulos presos à placenta através de funículos ramificados.

As Cactaceae são membros da ordem monofilética Caryophyllales (Barthlott & Hunt 1993, Bittrich 1993, Takhtajan 1997, Judd *et al.* 2002), a qual inclui 12-18 famílias tradicionais, compreendendo cerca de 10000 espécies. A ordem Caryophyllales possui caracteres florais (placentação central livre ou basal), vegetativos (crescimento secundário anômalo do caule), embriológicos (óvulos campilotrópicos, semente com perisperma ao invés de endosperma, micrópila formada pelo integumento interno), químicos e fisiológicos distintos, presentes em geral universalmente dentro da ordem, sendo raros ou ausentes em outras angiospermas (Cronquist 1981, Bittrich 1993). Esse grupo de famílias que compõem a ordem Caryophyllales foi identificado por Braun (1864) como um grupo natural. Um dos caracteres mais notáveis é a substituição, na maioria das Caryophyllales, de pigmentos do tipo antocianina, derivadas de flavonóides, por pigmentos do tipo betalaína ("cromoalcalóides"), derivados de tirosina, o que não ocorre em outras plantas (Cronquist 1981). Estas características relativamente incomuns de fisiologia (metabolismo C4 ou CAM) ou ecologia (habitats áridos e/ou salgados) caracterizam todas ou grande parte das Caryophyllales. Entre outros caracteres presentes na ordem estão: plastídios dos elementos de tubo crivado com filamentos de proteína periféricos e um cristalóide de proteína central (exceto em Amaranthaceae/Chenopodiaceae); presença de ácido ferúlico nas paredes não lignificadas; desenvolvimento centrífugo do androceu; crescimento secundário anômalo; pólen trinuclear, microperfurado e microspinulado; ramos do estilete internamente estigmáticos em toda sua extensão; sementes exotestais e endotêgmicas, germinando através de um opérculo (Bittrich 1993, Stevens 2002). Os estudos filogenéticos baseados em seqüências de DNA confirmaram a naturalidade das Caryophyllales *sensu* Braun (= Centrospermae), mas identificaram também um grupo monofilético maior, do qual as Caryophyllales

sensu Braun fazem parte (Soltis *et al.* 2000). Esse grupo inclui Polygonaceae e Plumbaginaceae, mas também diversas famílias que nunca haviam sido consideradas próximas, como Droseraceae, Simmondsiaceae, Asteropeiaceae e Physenaceae.

Estudos com seqüências do fragmento ITS do DNA nuclear ribossomal indicam que a família Cactaceae está inserida dentro de linhagens de Portulacaceae adaptadas ao ambiente árido (Hershkovitz & Zimmer 1997). Isso torna as Portulacaceae uma família parafilética, e sugere que a diversificação de Cactaceae deve ter sido muito rápida, ocorrendo após a conquista de ambientes áridos de deserto. Segundo Judd *et al.* (2002), uma parte das Portulacaceae apresenta algumas características em comum com as Cactaceae como a parede dos frutos diferenciada em duas camadas e apresentando tricomas axilares.

Barthlott & Hunt (1993) aceitam a divisão de Cactaceae em três subfamílias. Estudos de variação do DNA de cloroplastos fornecem forte suporte para o monofiletismo das subfamílias Opuntioideae e Cactoideae, mas a subfamília Pereskioideae não é bem sustentada como sendo monofilética (Wallace 1995), uma vez que foram encontrados caracteres derivados (sinapomorfias) presentes unicamente em *Maihuenia* (Phil. ex F.A.C. Weber) K. Schum. e *Pereskia* Mill. Segundo Hunt (1998), *Maihuenia* merece o status de subfamília distinta (Maihuenioideae). Estudos utilizando dados de nucleotídeos propõem o reconhecimento de Maihuenioideae como subfamília Wallace & Gibson (2002).

A subfamília Cactoideae representa grande parte das espécies da família (três quartos) e seu monofiletismo é sustentado por uma série de caracteres morfológicos como a redução ou perda completa das folhas, presença da região do hilo nas sementes, além da presença das costelas em muitas espécies (Judd *et al.* 2002) e moleculares, como a presença de uma deleção do intron *rpoC1* no genoma

do cloroplasto (Wallace & Cota 1996, Nyffeler 2002). Segundo Barthlott & Hunt (1993), a subfamília está dividida em 9 tribos. Dentre essas tribos, a predominante no leste do Brasil é Cereeae, tanto em número de gêneros como de espécies (Zappi 1992).

O gênero *Micranthocereus* Backeb. (tribo Cereeae, subfamília Cactoideae) inclui nove espécies de distribuição restrita ao Brasil (Taylor 2000). A maioria das espécies ocorre em Minas Gerais e Bahia, sendo uma espécie restrita aos Estados de Goiás e Tocantins. São plantas arbustivas e colunares, ramificadas na base ou solitárias. O caule é cilíndrico, geralmente glauco, com costelas estreitas apresentando espinhos e algumas vezes longos tricomas lanosos. O cefálio é dotado de aréolas com tricomas lanosos ou cerdas. As flores são tubulares, diurnas ou noturnas apresentando segmentos do perianto externo diversamente coloridos. Os frutos apresentam polpa funicular branca ou polpa ausente.

O gênero *Micranthocereus* apresenta uma grande variação em seus caracteres vegetativos e reprodutivos, como visto acima. Algumas dessas variações também estão presentes em outros gêneros da tribo Cereeae, sendo que sua posição dentro da tribo continua incerta. As relações infragenéricas de *Micranthocereus* assim como sua relação entre os gêneros proximamente relacionados ainda não foram examinados num contexto filogenético. Com o intuito de investigar o monofiletismo do gênero *Micranthocereus* e determinar as relações filogenéticas entre as espécies e gêneros proximamente relacionados dentro da tribo Cereeae serão utilizados dados morfológicos e de seqüenciamento de DNA para tentar obter informações úteis para o esclarecimento da história evolutiva do gênero.

SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA

A sistemática filogenética baseia-se na elaboração de hipóteses sobre as relações de parentesco entre espécies e grupos de espécies, sendo apoiada na teoria da evolução (Hening 1966). A abordagem filogenética da sistemática implica no reconhecimento de grupos monofiléticos e permite, desta forma, a compreensão de uma variedade de fenômenos evolutivos em um contexto histórico, tais como processos de adaptação e especiação, diversificação e especialização ecológica, coevolução e biogeografia (Brooks & McLennam 1991).

Os avanços teóricos e metodológicos da sistemática filogenética, a disponibilidade de programas de computador que podem lidar com grande número de dados e acesso a novas fontes de informação, como dados moleculares, vem contribuindo, cada vez mais, para a compreensão das relações de parentesco entre organismos, permitindo o desenvolvimento de hipóteses filogenéticas mais robustas (Donoghue & Sanderson 1992).

Caracteres moleculares apresentam vantagens sobre os morfológicos pois geralmente podem ser determinados objetivamente, são abundantes e podem ser extraídos muitas vezes a partir de pequenas porções de material biológico. Entretanto, a detecção de relações de homologia em dados moleculares é problemática e as dificuldades podem ser ainda maiores do que as encontradas com dados morfológicos, sobretudo, devido à possibilidade de ocorrer transferência horizontal e convergência gênica (Meyer 1997). Assim, apesar das vantagens da utilização de dados moleculares, não se justifica a exclusão de caracteres morfológicos no estudo de relações de parentesco entre espécies (Donoghue & Sanderson 1992). Além disso, questiona-se a utilidade de uma árvore

filogenética construída com caracteres moleculares se não há caracteres morfológicos claros e bem definidos que caracterizem os clados.

REGIÕES NÃO CODIFICADORAS DOS GENES *trn* (TRANSFER RNA) DO GENOMA DE CLOROPLASTO

Diferentes regiões do DNA de cloroplasto têm sido intensamente utilizadas para investigação de relações filogenéticas em plantas (Palmer *et al.* 1988), embora a taxa relativamente baixa de mutação em muitas regiões seja uma séria limitação no estudo de relação de parentesco em nível infragenérico. Entretanto, as regiões não-codificadoras do cloroplasto apresentam geralmente uma elevada frequência de mutações (Palmer *et al.* 1988) e, por isso, têm sido utilizadas em estudos envolvendo taxa também em baixos níveis hierárquicos de classificação.

Um DNA genômico de cloroplasto típico constitui-se de uma molécula circular caracterizada por dois segmentos repetidos e inversos entre si, que separam duas regiões únicas, uma mais longa e outra mais curta. Uma das vantagens de se estudar o genoma de cloroplastos incluem seu tamanho reduzido (geralmente entre 120 a 200 kb) e o fato de que a maioria dos genes de cloroplastos são cópias únicas, ao contrário do ITS e outros genes nucleares que pertencem a famílias multigênicas (Soltis & Soltis 1998).

O fragmento *trnL-trnF* constitui uma região não-codificadora do genoma de cloroplasto, que inclui o íntron *trnL* (UAA), com aproximadamente 350-600 pares de bases, e o espaçador intergênico localizado entre o éxon *trnL* (UAA) 3' e o gene *trnF* (GAA), apresentando entre 120-350 pares de bases. Vários estudos já demonstraram a utilidade desta região em estudos filogenéticos considerando gêneros e espécies (Gielly & Taberlet 1996, Baker *et al.* 1999, Applequist & Wallace 2000). Esse segmento foi utilizado no presente estudo, após tentativas infrutíferas com outros marcadores, como o íntron ITS do DNA nuclear ribossômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLEQUIST, W. L. & WALLACE, R. S. 2000. Phylogeny of the Madagascan endemic family Didieriaceae. *Pl. Syst. Evol.* 221: 157-166.
- BAKER, W. J., ASMUSSEN, C. B., BARROW, S. C., DRANSFIELD, J., HENDERSON, T. A. 1999. A phylogenetic study of the family Palmae based on chloroplast DNA sequences from the *trnL-trnF* region. *Pl. Syst. Evol.* 219: 111-126.
- BARTHLOTT, W. & HUNT, D. R. 1993. Cactaceae: In: Kubitzki, K., Rohwer, J. G. & Bittrich, V. (Eds.) *The families and genera of vascular plants*, Vol. II. Springer: Berlin, pp: 161-197.
- BITTRICH, V. 1993. Introduction to Centrospermae. In: Kubitzki, K., Rohwer J. G. & Bittrich, V. (Eds.) *The families and genera of vascular plants*, Vol. II. Springer: Berlin, pp. 13-19.
- BOKE, N. H. 1964. The cactus gynoecium: a new interpretation. *Am. J. Bot.* 51: 598-610.
- BRAUN, A. 1864. Übersicht des natürlichen Systems. In: Ascherson, P. (Ed.) *Flora der Provinz Brandenburg, der Altmark und des Herzogthums Magdeburg*. Berlin, August Hirschwald, pp. 22-76
- BROOKS, D. R. & MCLENNAM, D. A. 1991. *Phylogeny, ecology, and behavior – a research program in comparative biology*. The University of Chicago Press: Chicago and London.
- BUXBAUM, F. 1953. *Morphology of cacti. Section II. The flower*. Abbey Garden Press, Pasadena.

- CRONQUIST, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- DONOGHUE, M. J. & SANDERSON, M. J. 1992. The suitability of molecular and morphological evidence in reconstructing plant phylogeny: In: Soltis, P., Soltis, D. & Doyle, J. J. (Eds.) Molecular systematics of plants. Chapman and Hall, New York and London, pp: 340-368.
- GIBSON, A. C. & NOBEL, P. S. 1986. The cactus primer. Harvard University Press: Cambridge, Mass.
- GIELLY, L. & TABERLET, P. 1996. A phylogeny of the european genties inferred from chloroplast trnL (UAA) intron sequences. Bot. J. Linn. Soc. 120: 57-75.
- HENING, W. 1966. Phylogenetic systematics. (Trad. Davis D. & R. Zanger). University of Illinois Press, Urbana.
- HERSHKOVITZ, M. A. & ZIMMER, E. A. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. Taxon 46: 217-232.
- HUNT, D. 1998. Cactaceae. Consensus initiatives. Vol. 5. Sherborne, UK.
- HUNT, D. 1999. CITES Cactaceae checklist. 2 Ed. Royal Botanic Gardens Kew, UK
- HUNT, D. R. & TAYLOR, N. P. 1986. The genera of Cactaceae: towards a new consensus. Bradleya 4: 65-78.
- HUNT, D. R. & TAYLOR, N. P. 1990. The genera of Cactaceae: towards a new consensus. Bradleya 8: 85-107.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. & DONOUGHUE, M. J. 2002. Plant systematics, a phylogenetic approach. 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- LEINS, P. & SCHWITALLA, S. 1988. Placentation in Cactaceae. In: Leins, P., Schwitalla, S., Tucker, S. C. & Endress, P. K. (Eds.) Aspects of floral development. Berlin: J. Cramer, Borntraeger. pp: 57-68.
- MAUSETH, J. 1989. Comparative structure-function studies within a strongly dimorphic plant, *Melocactus intortus*. *Bradleya* 7: 1-12.
- MEYER, D. 1997. Análises filogenéticas e seqüências de DNA. In: Amorin, D. S. (Ed.) Elementos básicos de sistemática filogenética. Holos Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia, Ribeirão Preto, pp: 187-212.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnk/matK* and *trnL-trnF* sequences. *Am. J. Bot.* 89(2): 312-326.
- PALMER, J. D., JANSEN, R. K., MICHAELS, H. J., CHASE, M. W., MANHART, J. R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- SALGADO, T. T. & MAUSETH, J. 2002. Shoot anatomy and morphology. In: Nobel, P. S. (Ed.). *Cacti, biology and uses*. University of California Press, pp: 23-40.
- SOLTIS, D. E. & SOLTIS, P. S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. (Eds.) *Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academic Publisher, Boston, Dordrecht, London.
- 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, K. C. & FARRIS, J. S. 2000. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcl*, and *atpB* sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 133: 381-461.
- STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 3, November 2002. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

- TAKHTAJAN, A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- TAYLOR, N. P. 1997. Cactaceae. In: Oldfield, S. (Ed.). Cactus and Succulent Plant - Status survey and conservation action plan. IUCN Gland, Cambridge.
- TAYLOR, N. P. 2000 (ined.). Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of Eastern Brazil, Supplement 1 (Formal Taxonomic Treatment of the Cactaceae of Eastern Brazil). PhD Thesis. Open University, Milton Keynes.
- TAYLOR, N. P. & ZAPPI, D. C. 1989. An alternative view of generic delimitation and relationships in tribe Cereeae (Cactaceae). *Bradleya* 7: 13-40.
- WALLACE, R. S. 1995. Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate cactus phylogeny. *Bradleya* 13: 1-12.
- WALLACE, R. S. & COTA, J. H. 1996. An intron loss in the chloroplast gene *rpoC1* supports a monophyletic origin for the subfamily Cactoideae of the Cactaceae.
- WALLACE, R. S. & GIBSON, A. G. 2002. Evolution and systematics. In: Nobel, P. S. (Ed.) *Cacti, biology and uses*. University of California Press, pp: 1-22.
- ZAPPI, D. C. 1992 (ined.). Revisão taxonômica de *Pilosocereus* Byles & Rowley (Cactaceae) no Brasil. Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, USP, São Paulo, SP.

CAPÍTULO 1 - ESTUDO CLADÍSTICO DO GÊNERO *MICRANTHOCEREUS* BACKEB. (CACTACEAE)

INTRODUÇÃO

Micranthocereus é um gênero endêmico do Brasil, de hábito arbustivo e colunar (Barthlott & Hunt 1993), ramificado na base ou de ramificação ausente; de caule cilíndrico, com 10-30-∞ costelas estreitas; aréolas próximas entre si, com espinhos e algumas vezes longos tricomas lanosos. A zona fértil é constituída por um cefálio contínuo ou não, superficial ou imerso, dotado de aréolas com tricomas lanosos ou cerdosos; as flores são tubulares, 1,5-5cm de comprimento, predominantemente diurnas ou noturnas; o pericarpelo e o tubo são nus, exceto quando cobertos por escamas diminutas; as tépalas são curtas, eretas ou patentes, diversamente coloridas. Os frutos são indeiscentes, purpúreos, verdes ou róseo-enegrecidos, conspícuos ou imersos no cefálio; restos florais tardiamente decíduos ou persistentes; polpa funicular escassa, branca.

O gênero *Micranthocereus* foi descrito por Backeberg (1938) a partir de uma única espécie, *Cephalocereus polyanthus*, quando o autor retirou esta espécie do gênero *Cephalocereus* Pfeiffer, devido algumas características como suas flores pequenas e presença de pseudocefálio, não presentes em *Cephalocereus*. Posteriormente, os gêneros estabelecidos por *Austrocephalocereus* Backeberg (1938) e *Sicobaccatus* Braun & Esteves Pereira (1990) foram sinonimizados a *Micranthocereus* por Ritter (1979) e Taylor (1991), ampliando ainda mais a circunscrição do gênero.

Segundo Barthlott & Hunt (1993), o gênero inclui nove espécies que ocorrem no Brasil central e leste. De acordo com Taylor (2000), das nove espécies de *Micranthocereus*, oito ocorrem no norte de Minas Gerais e Bahia (Figs. 1 e 2). Uma

espécie, *Micranthocereus estevesii* (Buining & Brederoo) F. Ritter ocorre fora da área geográfica típica das outras espécies, sendo endêmica de afloramentos de calcário em volta da Serra Geral de Goiás e também em Tocantins (Taylor 2000) (Fig. 2). De acordo com este autor, *Micranthocereus* é subdividido em três subgêneros: subg. *Micranthocereus*: com caule não lenhoso, ramificado na base, ereto ou decumbente, apresentando espinhos de crescimento exacerbado nas aréolas basais do caule (espinhos hipertróficos) (Figs. 3A, 3F, 4A, 4C, 4D e 4E); subg. *Austrocephalocereus* (Backeb.) P. J. Braun & Esteves Pereira: com caule lenhoso, ereto e ramificado na base ou unicaule e freqüentemente inclinado, sem apresentar espinhos de crescimento exacerbado desenvolvidos na base do caule (Figs. 3B, 3D, 3E e 4B); subg. *Siccobaccatus* (P. J. Braun & Esteves Pereira) Taylor: com caule lenhoso, unicaule, ereto, apresentando espinhos de crescimento exacerbado na base do caule (Figs. 4F e 4G). As espécies pertencentes ao gênero *Micranthocereus* são ilustradas nas figuras 3 e 4. Uma chave de identificação para as espécies de *Micranthocereus* encontra-se no apêndice 4.

Na análise cladística apresentada por Taylor & Zappi (1989) utilizando-se apenas caracteres morfológicos, *Pilosocereus* surge em alguns cladogramas como o grupo irmão de um ramo formado por *Austrocephalocereus* Backeb., *Coleocephalocereus*, *Micranthocereus* e *Melocactus*: (PILOSO (AUSTROCEPHALO (COLEOCEPHALO (MICRANTHO, MELOCACTUS)))). *Austrocephalocereus* foi posteriormente sinonimizado a *Micranthocereus* (Hunt & Taylor 1990, Hunt 1992, Hunt 1999) e tal classificação é mantida por Taylor (2000). No estudo cladístico realizado por Taylor & Zappi (1989), *Micranthocereus* faz parte, juntamente com *Melocactus*, *Coleocephalocereus* e *Austrocephalocereus*, de um grupo monofilético, provisoriamente definido como subtribo Melocactinae F. Buxbaum, definida pelas sinapomorfias : (1) perda de lignificação conspícua no cilindro central, (2) cefálio lateral aprofundado (terminal somente em *Melocactus*), (3) restos de perianto não

enegrecidos quando secos no fruto e (4) morfologia do ápice do fruto, com restos do perianto inseridos superficialmente. Segundo essa análise cladística da tribo, *Pilosocereus* apresenta poucos caracteres derivados em comum com a subtribo Melocactinae, entre eles a clara perda de lignificação no cilindro central. Os resultados apresentados devem contudo ser vistos com cautela. No citado estudo cladístico da tribo Cereeae, foram usados relativamente poucos caracteres, e alguns deles quantitativos, sem que houvesse uma delimitação clara dos estados de caracteres (por exemplo, diâmetro do fruto até 10mm ou > 10mm).

Devido à complexidade e incerteza envolvendo apenas o uso de caracteres morfológicos para definir linhagens evolutivas, o presente trabalho buscou incluir caracteres macromoleculares, visando uma melhor resolução na investigação das relações entre os gêneros da tribo Cereeae. Para isso, decidiu-se testar a filogenia do grupo por seqüenciamento de DNA de cloroplastos. Para tanto, escolheu-se um marcador bastante difundido em reconstruções filogenéticas na família Cactaceae, que é a região *trnL-F*. Esta região codifica os RNAs de transferência para aminoácidos leucina e fenilalanina, além de conter um espaçador intergênico e ainda um intron do grupo I no gene *trnL* (Bakker *et al.* 2000, Taberlet *et al.* 1991).

A inclusão de dois gêneros (*Austrocephalocereus* e *Sicobaccatus*) a *Micranthocereus*, trouxe incerteza quanto a sua delimitação genérica. A atual delimitação de *Micranthocereus* inclui muitos caracteres que também estão presentes em outros gêneros da tribo Cereeae. No entanto, essa nova delimitação de *Micranthocereus* não considerou a aplicação de análises filogenéticas para compreensão da história evolutiva deste grupo e para verificação de seu monofiletismo.

Os principais objetivos do presente estudo foram: (1) investigar o monofiletismo do gênero *Micranthocereus*; (2) determinar as relações filogenéticas entre as espécies e gêneros proximamente relacionados dentro da tribo Cereeae, e então avaliar os limites genéricos dentro deste grupo; (3) reavaliar os caracteres morfológicos tradicionalmente usados para delimitar taxa, e (4) investigar aspectos da evolução de caracteres e da biogeografia, com base nos cladogramas obtidos.

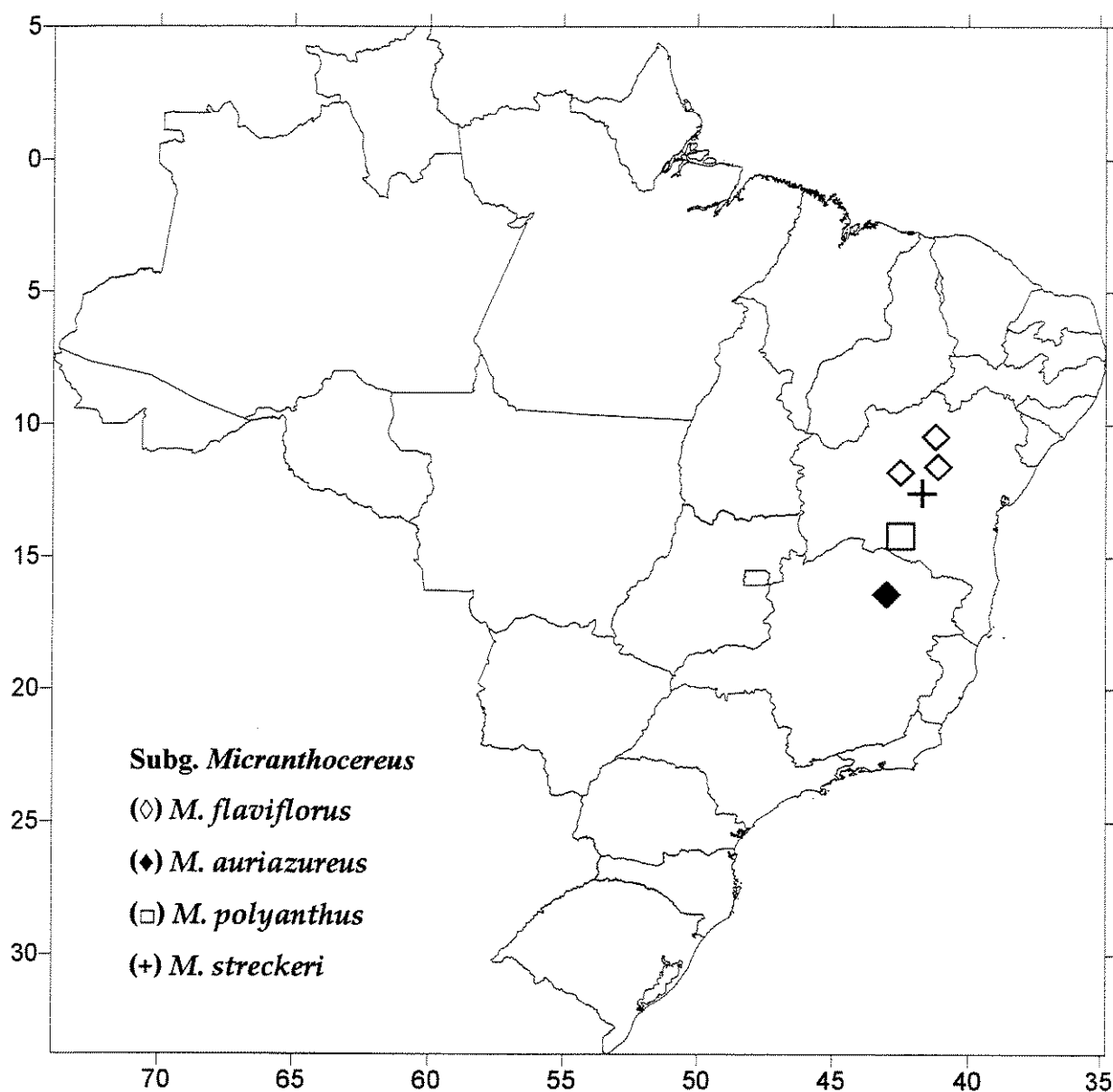


Figura 1: Mapa de distribuição das espécies pertencentes ao subg. *Micranthocereus*, endêmicas de Minas Gerais e Bahia. Entre estas espécies, *M. flaviflorus* (◇) é a que apresenta maior distribuição. As demais espécies apresentam distribuição restrita a apenas uma localidade.

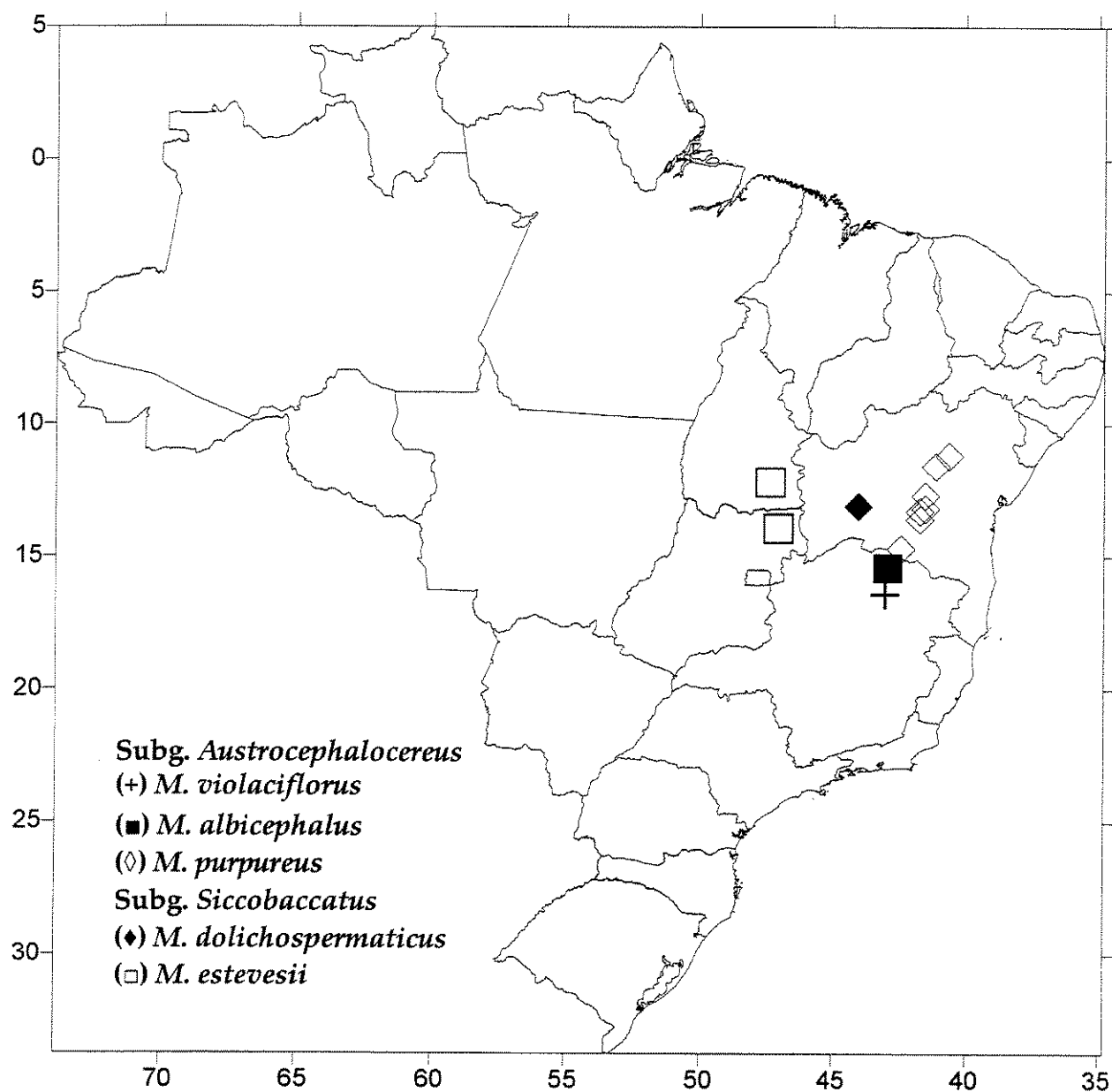


Figura 2: Mapa de distribuição das espécies pertencentes ao subg. *Austrocephalocereus* e ao subg. *Siccobaccatus*. *M. estevesii* (□) é a única espécie do gênero que ocorre fora da área geográfica típica das outras espécies.

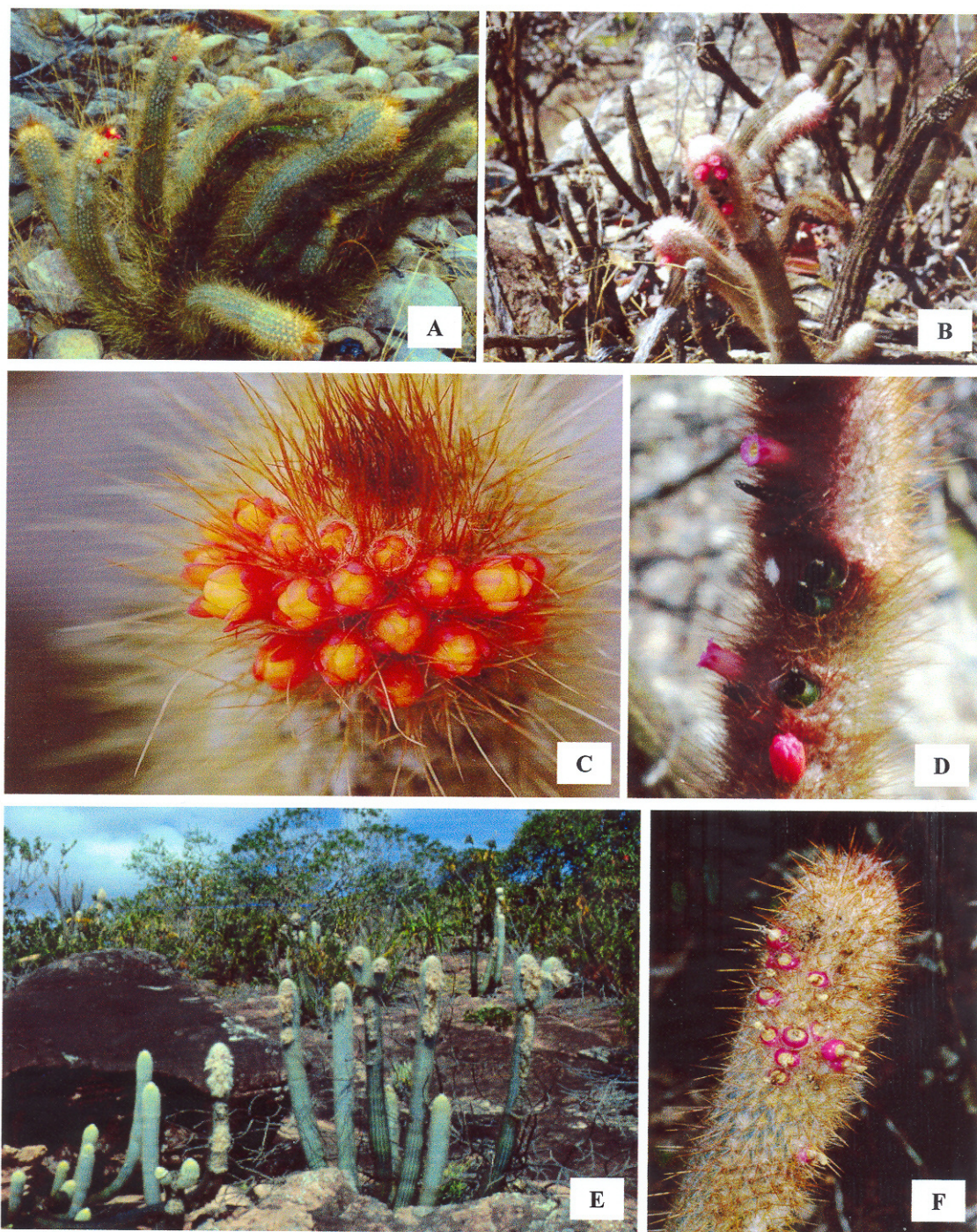


Figura 3. A, C: *M. flaviflorus* (A: L.Y.S. Aona 756 & R. Belinello, Cafarnaum, BA; C: M. C. Machado, s.n., Cafarnaum, BA). B, D: *M. violaciflorus* (B, D: L.Y.S. Aona 711 & R. Belinello, Grão Mogol, MG). E: *M. purpureus* (E: L.Y.S. Aona 755 & R. Belinello, Palmeiras, BA). F: *M. polyanthus* (F: L.Y.S. Aona 729 & R. Belinello, Caetité, BA). Subg. *Austrocephalocereus*: B, D e E. Subg. *Micranthocereus*: A e F. (C: foto de Marlon C. Machado).

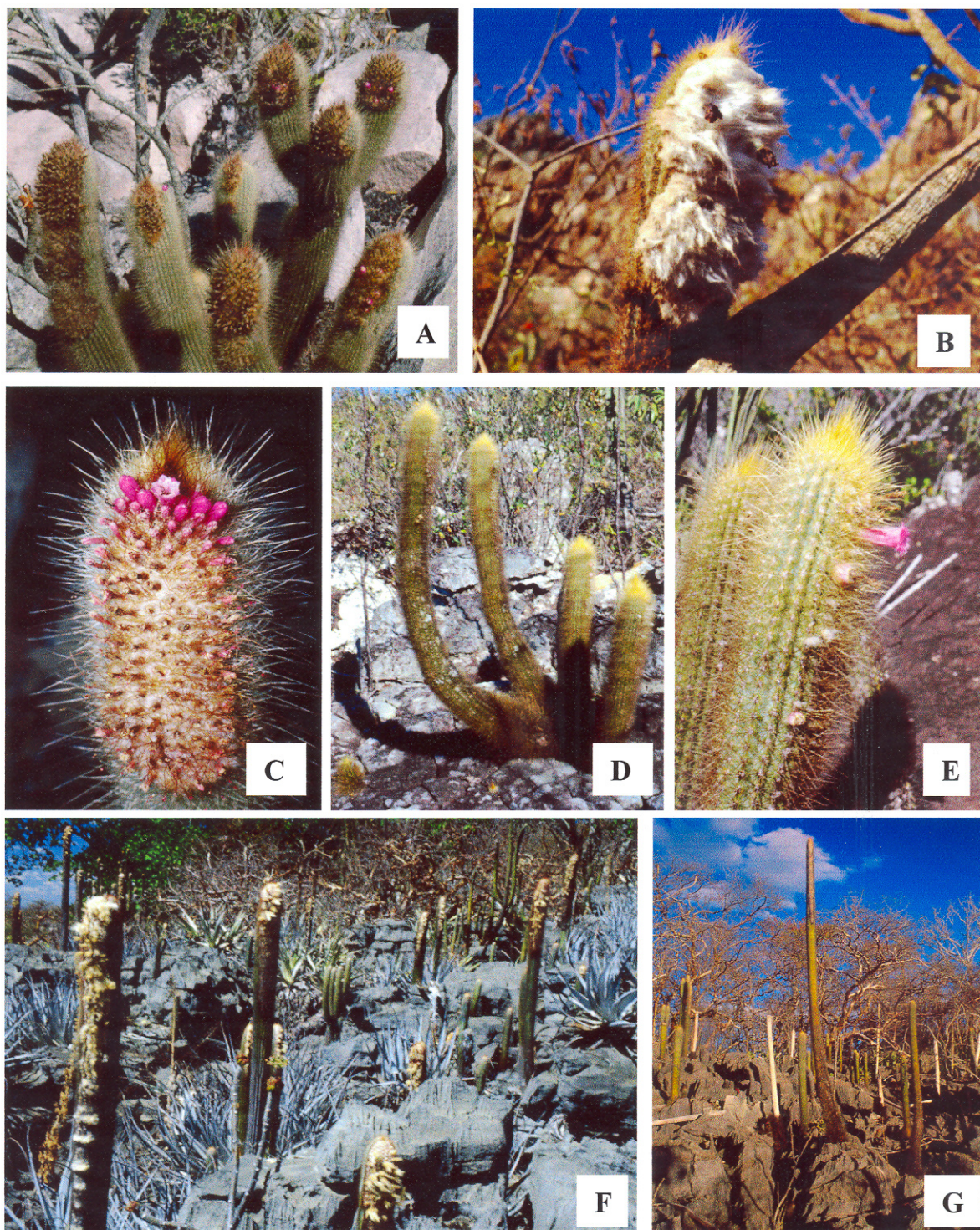


Figura 4. A, C: *M. streckeri* (A, C: L.Y.S. Aona 741 & R. Belinello, Seabra, BA). B: *M. albicephalus* (B: L.Y.S. Aona 722 & R. Belinello, Monte Verde, MG). D-E: *M. auriazureus* (D-E: L.Y.S. Aona 690 & R. Belinello, Grão Mogol, MG). F: *M. dolichospermaticus* (F: L.Y.S. Aona 734 & R. Belinello, Porto Velho, BA). G: *M. estevesii* (G: L.Y.S. Aona et al. 840, Nova Roma, GO). Subg. *Micranthocereus*: A, C, D e E, subg. *Austrocephalocereus*: B, subg. *Siccobaccatus*: F e G.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para reconstruir a filogenia das espécies de *Micranthocereus*, foram utilizados caracteres morfológicos e moleculares. Todas as espécies de *Micranthocereus* foram incluídas e ainda espécies pertencentes a quatro gêneros da tribo Cereeae. *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* foi utilizado como grupo externo na análise morfológica e *Cereus jamacaru* subsp. *calcirupicola*, na análise molecular. Na análise molecular foram utilizadas seqüências de *Micranthocereus albicephalus* e *Coleocephalocereus fluminensis* (Miquel) Backeb. que foram obtidas a partir de Nyffeler (2002).

A escolha dos gêneros utilizados como grupos externos foi baseada em estudos filogenéticos prévios com a tribo Cereeae (Taylor & Zappi 1989). Os gêneros incluídos na presente análise foram *Coleocephalocereus*, *Cereus*, *Pilosocereus* e *Melocactus* e estão ilustrados na figura 5.

Materiais-testemunho das espécies utilizadas nas análises moleculares estão listadas na Tabela 1.

Extração do DNA genômico, amplificação e seqüenciamento: o DNA foi extraído de material fresco. Para a extração foram utilizadas partes do caule, partes reprodutivas e principalmente raiz. A extração foi feita utilizando o Kit de extração Nucleon Phytopure (RPN 8511, Amersham/Life Science). Este método é indicado para amostras com grandes quantidades de polissacarídeos, que interferem no isolamento do DNA. O DNA foi precipitado durante cerca de 48 horas a -20°C com igual volume de isopropanol, centrifugado, lavado e seco. O “pellet” foi ressuscitado em 100µl de Tris-EDTA (TE) e estocado a -20°C. O DNA genômico foi quantificado em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo, retirando-se alíquotas de 12µl da cada amostra, e utilizando o padrão de concentração de

DNA fago λ , numa gama crescente de 25 a 100ng. A amplificação da região *trnL-F* foi realizada utilizando-se um termociclador de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, seguida de 29 ciclos de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento a 48°C por um minuto, e extensão final a 72°C por um minuto e trinta segundos. Após esses 29 ciclos, foi feita a extensão a 72°C por mais dois minutos, e incubação a 15°C ao término do programa. O volume final das reações foi de 20 μ l, contendo MgCl₂, tampão Promega (Promega Corporation) e de *Taq* polimerase. Em todas as amostras foi adicionada polivinil pirrolidona (PVP) 1%. As reações de PCR seguiram o protocolo de Taberlet *et al.* (1991), utilizando-se os *primers* C e F para amplificar o pedaço inteiro (900-1100pb), incluindo o intron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-F*. Como marcador de peso molecular, foi usado o DNA do fago ϕ x 174 digerido com Hae III, misturado ao DNA do fago λ digerido com Hind III. Esse marcador é empregado para quantificar fragmentos de DNA de peso molecular que variam de 0,118 a 23,130 kb. Os produtos amplificados foram purificados utilizando-se 'QIAquick PCR cleaning column and filtration kit' (Qiagen Ltda, Dorking, Surrey, UK). As amostras foram diretamente seqüenciadas utilizando-se 'ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit' (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster, Califórnia, USA) e o seqüenciador automático ABI 377, da Applied Biosystems. As reações foram realizadas conforme protocolo do fabricante. Os softwares "Sequence Navigator™" e "Autoassembler™" foram usados para editar e montar as seqüências complementares, alinhando-as. As seqüências de DNA foram alinhadas manualmente, e 'gaps' foram codificados como valores perdidos. Os protocolos de extração de DNA, reação de PCR e purificação dos produtos de PCR encontram-se nos Anexos 1, 2 e 3, respectivamente.

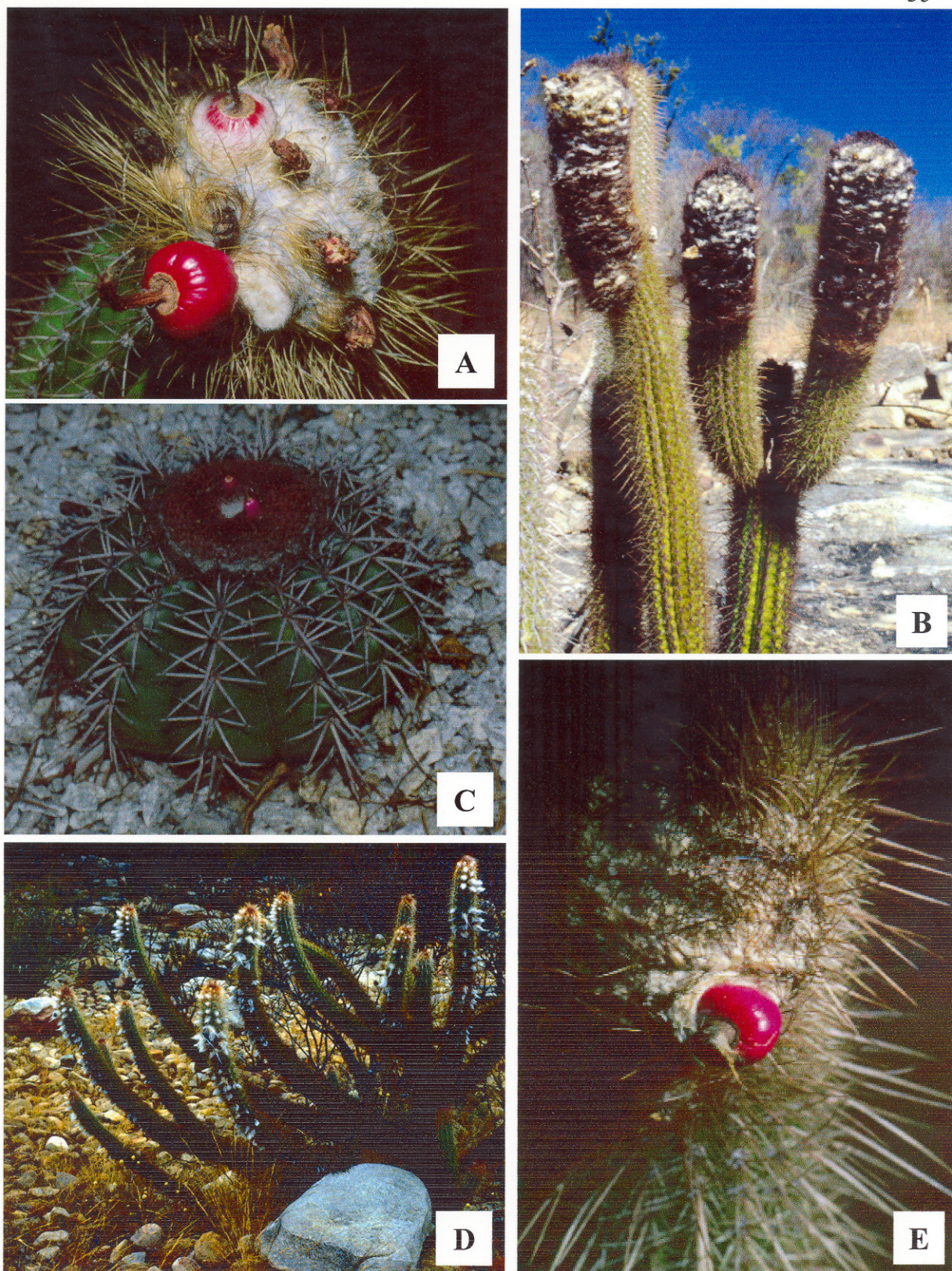


Figura 5: A: *Coleocephalocereus fluminensis* (A: E.L. Borba s.n., Juiz de Fora, MG). B, E: *Coleocephalocereus goebelianus* (B: L.Y.S. Aona 724 & R. Belinello, Espinosa, BA; E: L.Y.S. Aona 769 & R. Belinello, Tanhuaçu, BA). C: *Melocactus conoideus* (C: L.Y.S. Aona s.n. & R. Belinello, Vitória da Conquista, BA). D: *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* (D: L.Y.S. Aona *et al.* 817, Cafarnaum, BA).

Tab. 1. Amostras utilizadas para obtenção dos caracteres moleculares

Taxon	Localidade	Material testemunho
<i>Cereus jamacaru</i> subsp. <i>calcirupicola</i> (F. Ritter) Taylor & Zappi	MG, Serra do Cipó	L.Y.S. Aona <i>et al.</i> s.n. (UEC)
<i>Coleocephalocereus goebelianus</i> (Vaup.) Buining	BA, Espinosa	L.Y.S. Aona 724 & R. Belinello (UEC)
<i>Melocactus conoideus</i> Buining & Brederoo	BA, Vitória da Conquista	L.Y.S. Aona s.n. & R. Belinello (UEC)
<i>Micranthocereus auriazureus</i> Buining & Brederoo	MG, Grão Mogol	L.Y.S. Aona 690 & R. Belinello (UEC)
<i>Micranthocereus purpureus</i> (Gürke) F. Ritter	BA, Rio de Contas BA, Morro do Chapéu	L.Y.S. Aona 637 (UEC) L.Y.S. Aona 842 (UEC)
<i>Micranthocereus streckeri</i> van Heek & van Criel.	BA, Seabra	L.Y.S. Aona 741 & R. Belinello (UEC)
<i>Pilosocereus aurisetus</i> (Werderm.) Byles & Rowley subsp. <i>aurisetus</i>	MG, Serra do Cipó	L.Y.S. Aona <i>et al.</i> 98/24 (UEC)
<i>Pilosocereus gounellei</i> (Weber) Byles & Rowley subsp. <i>gounellei</i>	BA, Tanhuaçu	L.Y.S. Aona <i>et al.</i> 798 (UEC)
<i>Pilosocereus gounellei</i> subsp. <i>zehntneri</i> (Britton & Rose) Zappi	BA, Cafarnaum	L.Y.S. Aona <i>et al.</i> 817 (UEC)

Caracteres morfológicos. Material depositado nos Herbários ALCB, HUEFS, HRB, HRCB, MBML, SP, SPF, UB, RB e GUA, e principalmente material coletado no campo foram usados para investigar os caracteres morfológicos. O material coletado em campo foi essencial para o estudo morfológico, visto que alguns Herbários não possuíam exsicatas de *Micranthocereus* ou material com partes reprodutivas. No estudo cladístico com caracteres morfológicos, foi usado *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* como grupo externo. As descrições de formatos de partes florais, como ovário e câmara nectarífera entre outros estão de acordo com Radford *et al.* (1974). Os caracteres morfológicos e seus estados de caráter codificados são listados na Tabela 2 e a matriz morfológica está apresentada na Tabela 3. Dos 29 caracteres morfológicos selecionados para reconstrução da filogenia de *Micranthocereus*, cinco são de microscopia eletrônica de varredura (Barthlott & Hunt 2000). Caracteres desconhecidos foram codificados como '?'.

Análises filogenéticas. Todas as análises filogenéticas foram realizadas utilizando-se o programa PAUP versão 4.0 β 10 (Swofford 2002), usando o critério de parcimônia de Fitch (caracteres não ordenados, todos com peso igual, Fitch 1971), incluindo caracteres não informativos (autapomorfias) e otimização ACCTRAN, com ramos de comprimento igual a zero colapsados. Foi realizada a análise de 'branch and bound' para (1) seqüências de *trnL-F*, (2) dados morfológicos, e (3) dados morfológicos e moleculares combinados. A estratégia de busca usada para análise molecular e de dados combinados foi a de 1000 replicações para cada inclusão aleatória de cada táxon, opção MULTREES (salvando múltiplas árvores), e algoritmo TREE-BISSECTION-RECONNECTION (TBR), obtendo-se 10 árvores por replicação, e salvando todas as árvores mais curtas. Para verificar a sustentação dos clados obtidos nas árvores, foi realizado o teste de 'bootstrap' com 1000 replicações e com 10 replicações para adição aleatória de cada táxon, obtendo-se

uma árvore para cada replicação. Foram usadas as seguintes categorias para os valores de 'bootstrap': não suportado <50%, fracamente suportado 50-74%, moderadamente suportado 75-84%, fortemente suportado 85-100%. Na matriz de dados morfológicos e moleculares combinados, alguns caracteres morfológicos para as espécies *P. aurisetus* subsp. *aurisetus*, *P. gounellei* subsp. *gounellei* e *Melocactus conoideus* foram codificadas como dados desconhecidos (?). Para os dados morfológicos, os cladogramas foram calculados utilizando-se critério de parcimônia de Fitch. Caracteres morfológicos que apresentaram mais de dois estados foram considerados não ordenados, por não apresentarem uma direção perceptível na transformação dos caracteres. Quando o número de táxons não é muito grande, a busca do cladograma mais parcimonioso pode ser feita utilizando-se a análise de "branch and bound". A partir das árvores obtidas com "branch and bound" foi gerada uma árvore de consenso estrito. As mudanças nos estados de caracteres morfológicos foram traçadas com o auxílio do programa MacClade versão 4.0 (Maddison & Maddison 2000).

Tab. 2. Caracteres morfo-anatômicos, seus estados e respectiva polarização

-
0. **Ramificação basal:** (0) presente, (1) ausente
 1. **Grau de lignificação:** (0) caules maduros com forte lignificação, (1) caules maduros com pouca lignificação
 2. **Tricomas nas aréolas:** (0) presentes, (1) ausentes
 3. **Crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas da base do caule:** (0) ausente ou raro, (1) presente
 4. **Forma do ovário em corte longitudinal:** (0) obtriangular, (1) depresso oboval a depresso oval
 5. **Expulsão ativa do fruto a partir do cefálio:** (0) ausente, (1) presente
 6. **Forma da câmara nectarífera:** (0) estreitamente elíptica (oblonga), (1) oval a depresso oval, (2) oboval a depresso-oboval
 7. **Restos florais do perianto:** (0) persistentes, (1) tardiamente decíduos
 8. **Cefálio:** (0) descontínuo, (1) contínuo
 9. **Cefálio:** (0) superficial, (1) aprofundado
 10. **Forma do fruto:** (0) globoso, depresso, oboval a depresso-oboval, (1) obpiriforme
 11. **Coloração dos segmentos do perianto externo:** (0) creme a alvo, (1) diversamente colorido
 12. **Diâmetro da abertura interna (tubo floral) da flor durante a antese:** (0) maiores que 3mm, (1) menores que 2,3mm
 13. **Período da antese:** (0) predominantemente noturna, (1) predominantemente diurna
 14. **Ápice do fruto:** (0) ápice do pericarpo plano, (1) ápice do pericarpo côncavo
 15. **Posição dos segmentos internos do perianto durante a antese:** (0) reflexos, (1) eretos
 16. **Presença de polpa funicular:** (0) presente, (1) ausente
 17. **Coloração da polpa funicular:** (0) vinácea, (1) branca
 18. **Consistência da parede do fruto:** (0) fruto carnoso, (1) fruto seco
 19. **Deiscência do fruto:** (0) frutos deiscentes por fenda irregular transversal na parede do pericarpelo, (1) fruto circunciso na base, (2) indeiscente
 20. **Coloração dos restos do tubo floral e dos segmentos do perianto:** (0) negros, (1) acastanhados
 21. **Forma do pericarpelo.** (0) depresso globoso, (1) superficialmente obtriangular
 22. **Forma da semente:** (0) suborbicular, (1) alongada com região hilo-micropilar expandida
 23. **Coloração da semente:** (0) negra (atrofusca), (1) acastanhada
-

-
24. **Região hilomicropilar em relação ao corpo da semente:** (0) ângulo reto, (1) ângulo oblíquo
25. **Formato das células da testa em vista superficial:** (0) isodiamétricas, (1) alongadas
26. **Presença de crateras nas junções entre as células:** (0) ausentes, (1) presentes
27. **Escultura da superfície celular da testa:** (0) lisa, (1) finamente estriada
28. **Paredes periclinais das células da testa:** (0) paredes fracamente convexas, (1) fortemente convexas, (2) planas (retas)
-

Tab. 3. Matriz de dados morfológicos. (?) = dados não conhecidos ou não aplicáveis. (01) ou (12) = caráter polimórfico.

Todos os caracteres são 'não ordenados'.

Taxon	0 0	0 0	0	0 0	0	0 0	1 1	1 1 1	1 1 1 1	1 2 2 2 2	2	2	2	2	2
	0 1	2 3	4	5 6	7	8 9	0 1	2 3 4	5 6 7 8	9 0 1 2 3	4	5	6	7	8
<i>Pilosocereus</i> <i>gounellei</i> subsp. <i>zehntneri</i>	0 0	0 0	0	0 0	0	0 0	0 (01)	0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0	0	0	0	0	0
<i>Coleocephalocereus</i> <i>goebelianus</i>	1 0	0 0	?	1 ?	0	1 1	0 (01)	0 0 0	0 0 1 0	1 ? ? 0 0	1	0	0	1	1
<i>M. albicephalus</i>	0 1	0 0	1	? 1	1	1 1	1 0	0 0 ?	0 0 1 0	2 ? 0 0 0	1	0	1	1	1
<i>M. auriazureus</i>	0 1	0 1	0	? 2	1	0 0	0 1	0 1 1	0 0 1 0	0 1 0 0 0	1	0	0	0	2
<i>M.</i> <i>dolichospermaticus</i>	1 0	0 1	(01)	0 0	(01)	1 1	1 0	0 0 ?	? 1 ? 1	? 1 1 1 1	0	1	0	0	0
<i>M. estevesii</i>	1 0	0 1	(01)	0 0	(01)	1 1	1 0	0 0 ?	0 1 ? 1	1 1 1 0 0	1	0	0	0	1
<i>M. flaviflorus</i>	0 (01)	1 1	0	1 (12)	1	0 0	0 1	1 1 1	? 0 1 0	2 1 ? 0 0	1	0	0	0	0
<i>M. polyanthus</i>	0 1	1 1	0	? ?	1	0 0	0 1	1 1 1	? 0 1 0	2 1 ? 0 (01)	(01)	0	0	0	2
<i>M. purpureus</i>	0 0	1 (01)	0	1 2	1	1 1	0 1	0 0 (01)	0 0 1 0	2 ? ? 0 0	(01)	0	1	1	0
<i>M. streckeri</i>	0 1	0 1	(01)	1 1	1	1 (01)	0 1	1 1 1	0 0 1 0	2 1 1 0 0	1	0	0	1	0
<i>M. violaciflorus</i>	0 0	1 0	0	? 1	(01)	0 0	0 1	1 1 1	1 0 1 0	2 0 0 0 0	1	0	1	1	1

RESULTADOS

Caracteres morfológicos

A seguir, serão discutidos os caracteres utilizados na análise cladística e sua polarização.

Caráter 0. Ramificação basal. Apesar da evolução do desenvolvimento do hábito nunca ter sido estudada do ponto de vista filogenético, Gibson & Nobel (1986) sugerem que formas arbóreas e arbustivas de Cactaceae seriam hábitos considerados primitivos para a família. Entretanto, isso não se aplica ao gênero *Maihuenia* (Phil. ex F.A.C. Weber) K. Schum., visto que estudos com DNA de cloroplasto revelam ser este um dos gêneros mais basais de Cactaceae e, atualmente foi colocada numa subfamília própria, Maihuenioideae (Wallace 1995). Em espécies de grande porte, há um alargamento da medula, ou seja, durante o desenvolvimento anatômico ocorre um aumento do número e do diâmetro das costelas, enquanto que nas espécies cespitosas, geralmente com ramificação basal formada durante os primeiros estádios de crescimento da planta, a medula é mais delgada e as costelas são poucas e delgadas (Gibson & Nobel 1986). Segundo Zappi (1994), *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* é um táxon arborescente que apresenta dois tipos de ramificação: basal e acima da base (0). *Coleocephalocereus goebelianus* não apresenta nenhum tipo de ramificação basal (1), assim como *Micranthocereus dolichospermaticus* (Fig. 4F) e *Micranthocereus estevesii* (Fig. 4G). As demais espécies de *Micranthocereus* apresentam ramificação basal. *Micranthocereus violaciflorus* (Fig. 3B) foi descrita por Taylor (2000) como planta colunar, não ramificada, raro ramificada na base. A maior parte dos espécimes observados no campo durante o presente trabalho apresentavam ramificação basal, por isso, esse caráter foi codificado como (0).

Caráter 1. Grau de lignificação. É esperado que o desenvolvimento lenhoso reflita o hábito da planta (Gibson & Nobel 1986), entretanto isso não está perfeitamente correlacionado dentro do gênero *Micranthocereus*. Espécies de pequeno porte, como *Micranthocereus violaciflorus* possuem uma forte lenhosidade, enquanto *Micranthocereus albicephalus*, de até 2,5m, possui pouca lenhosidade. Um dos estados é a presença e caules maduros com forte lignificação (dificuldade em se cortar o caule=0) e caules maduros com pouca lenhosidade (facilidade em se cortar com faca=1). Embora esse caráter seja de grande importância, e por isso utilizado no presente estudo, esses estados de caráter foram designados baseados em experiência na preparação de material de herbário em campo e de comentários de Taylor (2000), e não de estudos anatômicos para quantificar o grau de lignificação do caule. Apesar de Taylor (2000) considerar *Micranthocereus flaviflorus* como não lenhoso, tivemos a oportunidade de observar um maior número de populações e verificamos que esta espécie apresenta indivíduos adultos variando entre os dois estados de caráter, nas duas populações observadas, por isso esse caráter foi codificado na matriz como sendo polimórfico.

Caráter 2. Presença de tricomas nas aréolas. As aréolas vegetativas de *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* não possuem tricomas (0=ausente), apenas as aréolas floríferas. O mesmo acontece com *Coleocephalocereus goebelianus*, *Micranthocereus streckeri*, *Micranthocereus albicephalus*, *Micranthocereus dolichospermaticus*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus auriazureus*. As outras espécies de *Micranthocereus* apresentam tricomas alvos em todas as aréolas (1=presente).

Caráter 3. Crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas da base do caule. Segundo Taylor e Zappi (1989), dentro da tribo Cereeae, apenas algumas espécies de *Micranthocereus* e *Coleocephalocereus* apresentam crescimento exagerado dos

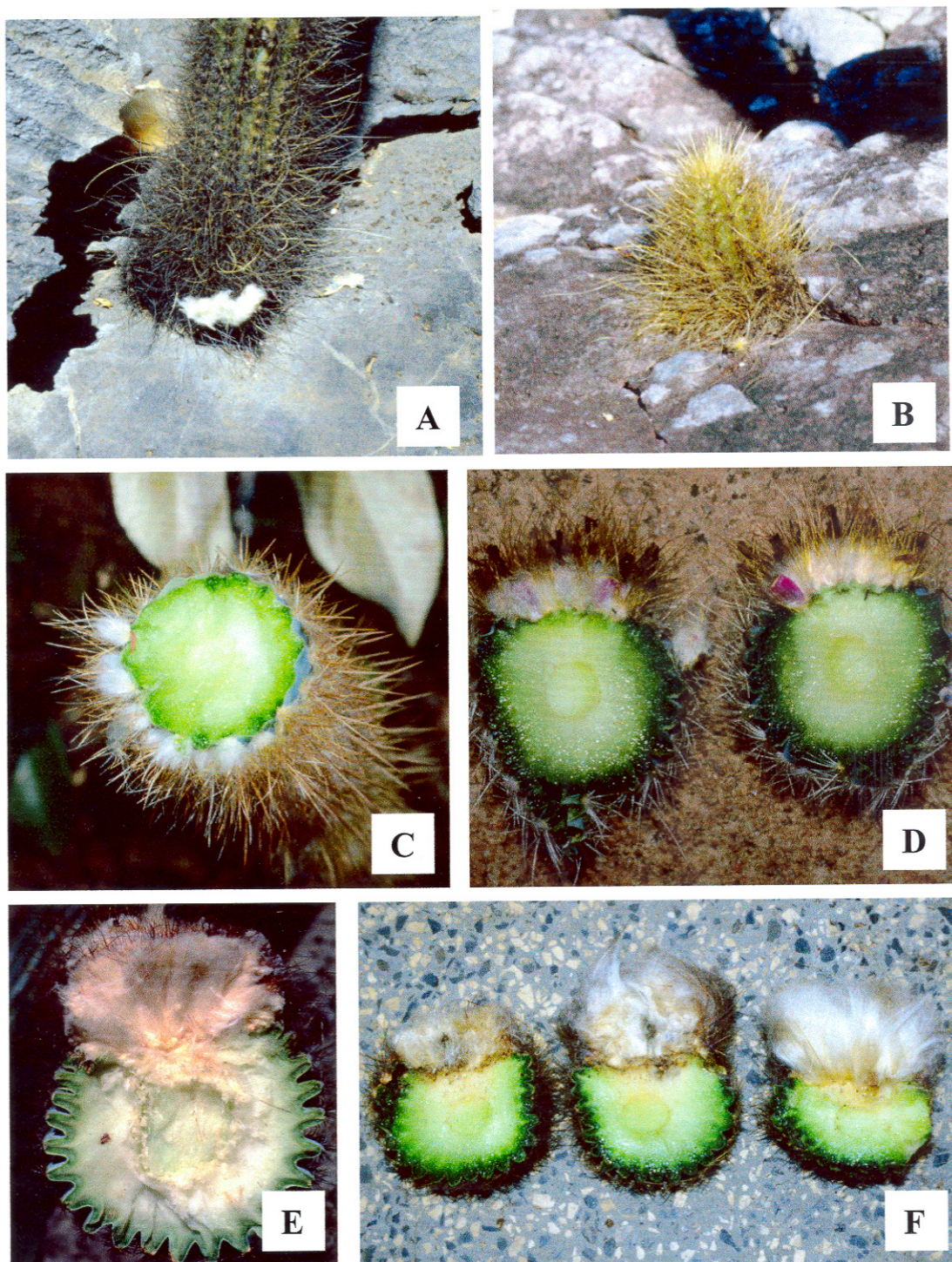


Figura 6. Espinhos hipertróficos na base do caule em indivíduos adultos de *M. dolichospermaticus* (A) e em indivíduos jovens de *M. auriazureus* (B). Corte transversal do cefálio do tipo superficial em *M. polyanthus* (C), superficial a aprofundado em *M. streckeri* (D) e aprofundado em *M. dolichospermaticus* (E) e *M. albicephalus* (F).

espinhos das aréolas basais. *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, *Coleocephalocereus goebelianus*, *Micranthocereus albicephalus* e *Micranthocereus violaciflorus* não apresentam crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas da base (0). Durante observações de campo, foi verificado que indivíduos de diferentes populações de *Micranthocereus purpureus* podem ou não apresentar crescimento exagerado dos espinhos basais e por isso esse caráter foi codificado como polimórfico. As demais espécies de *Micranthocereus* (Figs. 3A, 5A e B) apresentam crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas da base (1). Taylor (2000), com base numa pequena amostragem, definiu esse tipo de crescimento como sendo raro em *Micranthocereus streckeri*, porém, durante observações feitas numa população mais numerosa, verificou-se que esse crescimento está de fato presente em grande parte da população e, por isso, esse caráter foi codificado como (1) para esta espécie.

Caráter 4. Forma do ovário em corte longitudinal. A forma obtriangular (0) do ovário em corte longitudinal foi constante na maioria das espécies aqui analisadas e está presente em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*. Informação sobre a forma do ovário de *Micranthocereus polyanthus* foi obtida a partir de Taylor (2000), pois não foi possível observar espécimes com flores no campo. *Micranthocereus albicephalus* apresenta ovário depresso a depresso oboval (1). *Micranthocereus estevesii*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus streckeri* apresentaram tanto ovário obtriangular quanto ovário depresso a depresso oboval, sendo este caráter considerado polimórfico para estas espécies. Para *Coleocephalocereus goebelianus* esse caráter também foi codificado como '?' por não terem sido observadas flores desta espécie e também não ter sido obtida informação de literatura.

Caráter 5. Expulsão ativa do fruto a partir do cefálio. Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* não há expulsão ativa de fruto no cefálio (0=ausente). Esta

característica especializada é aparentemente restrita a *Melocactus* e *Coleocephalocereus* (Taylor & Zappi 1989), incluindo *Coleocephalocereus goebelianus* (1=presente), mas foi observada também nas espécies *Micranthocereus streckeri*, *Micranthocereus flaviflorus* e *Micranthocereus purpureus*. Na maturação, os frutos são forçados para fora do cefálio em pouco tempo, tornando-se visíveis para agente dispersores. Esse caráter é pouco conhecido para *Micranthocereus violaciflorus* e *Micranthocereus auriazureus*, *Micranthocereus albicephalus* e *Micranthocereus polyanthus* e por isso, foi codificado como '?'. .

Caráter 6. Forma da câmara nectarífera. A câmara nectarífera estreitamente elíptica (oblonga) (0) está presente em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii*. *Micranthocereus albicephalus*, *Micranthocereus streckeri* e *Micranthocereus violaciflorus* apresentaram câmara nectarífera oval a depresso oval (1). Já em *Micranthocereus auriazureus* e *M. purpureus*, o formato é oboval a depresso oboval (2). *Micranthocereus flaviflorus* apresenta variações entre os estados (1) e (2) e por isso, na matriz de dados esse caráter foi considerado polimórfico. Para *Micranthocereus polyanthus* e *Coleocephalocereus goebelianus*, por não terem sido observadas flores destas espécies e nem obtidas informações de literatura esse caráter foi codificado como '?'. .

Caráter 7. Restos florais do perianto. Na maioria das espécies de *Micranthocereus* os restos florais, quando secos, são eretos e tardiamente decíduos (1). Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus* os restos florais são persistentes (0). Este caráter foi baseado principalmente em observações de campo e na morfologia do ápice do fruto. *Micranthocereus dolichospermaticus*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus violaciflorus* apresentam ambos os estados de caráter e por isso foram codificados como polimórfico.

Caráter 8. Cefálio. Pode ser descontínuo (0) como em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, *Micranthocereus flaviflorus*, *Micranthocereus violaciflorus*, *Micranthocereus auriazureus*, *Micranthocereus polyanthus* ou contínuo (1) como em *Coleocephalocereus goebelianus* e nas demais espécies de *Micranthocereus*.

Caráter 9. Cefálio. Como foi comentado, um cefálio considerado verdadeiro é aquele onde há uma imersão das aréolas floríferas no ramo, que acaba perdendo a função vegetativa (não sendo capaz de efetuar fotossíntese) e apresenta aréolas muito modificadas. Este tipo de cefálio é do tipo aprofundado (1) e está presente em *Coleocephalocereus goebelianus*, *Micranthocereus albicephalus* (Fig. 6F), *Micranthocereus dolichospermaticus* (Fig. 6E), *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus purpureus*. Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e em algumas espécies de *Micranthocereus* (Fig. 6C), o cefálio é superficial (0) e não chega a modificar a aréola. Em *Micranthocereus streckeri* (Fig. 6D) esse caráter pode variar e foi codificado como sendo polimórfico.

Caráter 10. Forma do fruto. O formato do fruto dentro da tribo Cereeae e em particular das espécies analisadas apresenta grande variabilidade. Para facilitar o uso desse caráter foram considerados apenas dois estados de caráter. O primeiro deles reúne frutos considerados globosos, depressos, obovais e depresso-obovais (0). Apesar dessa variação, essas formas são semelhantes e muitas das espécies de *Micranthocereus* apresentaram mais de uma das formas citadas. Taylor (2000) classifica os frutos de algumas espécies de *Micranthocereus* como turbinados. Após uma análise mais detalhada desses frutos e consideramos essas formas como obpiriforme, segundo Radford *et al.* (1974). Assim, apenas *Micranthocereus dolichospermaticus*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus albicephalus* apresentam frutos obpiriformes (1). Taylor (2000) descreve os frutos de *Micranthocereus purpureus* como largamente turbinados ("broadly turbinate"),

entretanto frutos coletados e obtidos através de material cultivado mostraram-se sempre globosos a depresso-obovais (Fig. 7B), e por isso, no presente trabalho, foi codificado como (0).

Caráter 11. Coloração dos segmentos do perianto externo. Dentro da família Cactaceae ocorre uma ampla variação na coloração dos segmentos do perianto externo, que muitas vezes pode estar relacionado ao seu modo de polinização (Barthlott & Hunt 1993). Foram reconhecidos apenas dois estados para esse caráter, pois a maioria das espécies do gênero *Micranthocereus* apresenta segmentos do perianto externo diversamente coloridos (1), podendo ocorrer várias tonalidades das cores rosa, laranja e vermelha na maioria das espécies. Dados de *Micranthocereus polyanthus* foram obtidos a partir de Taylor (2000). Apenas *Micranthocereus albicephalus*, *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* apresentam segmentos do perianto externo cremes a alvos (0). Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus* esse caráter pode variar entre os dois estados, sendo considerado polimórfico para essas espécies.

Caráter 12. Diâmetro da abertura interna (tubo floral) da flor durante a antese. Esse caráter foi baseado principalmente em observações de campo e através de material em cultivo. *Micranthocereus flaviflorus*, *Micranthocereus violaciflorus*, *Micranthocereus streckeri* e *Micranthocereus polyanthus* apresentam diâmetro da abertura da flor, que é representado pela abertura do tubo floral, durante antese sempre menor que 2,3mm (1). Nas demais espécies estudadas o diâmetro é maior que 3mm (0), incluindo *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus*.

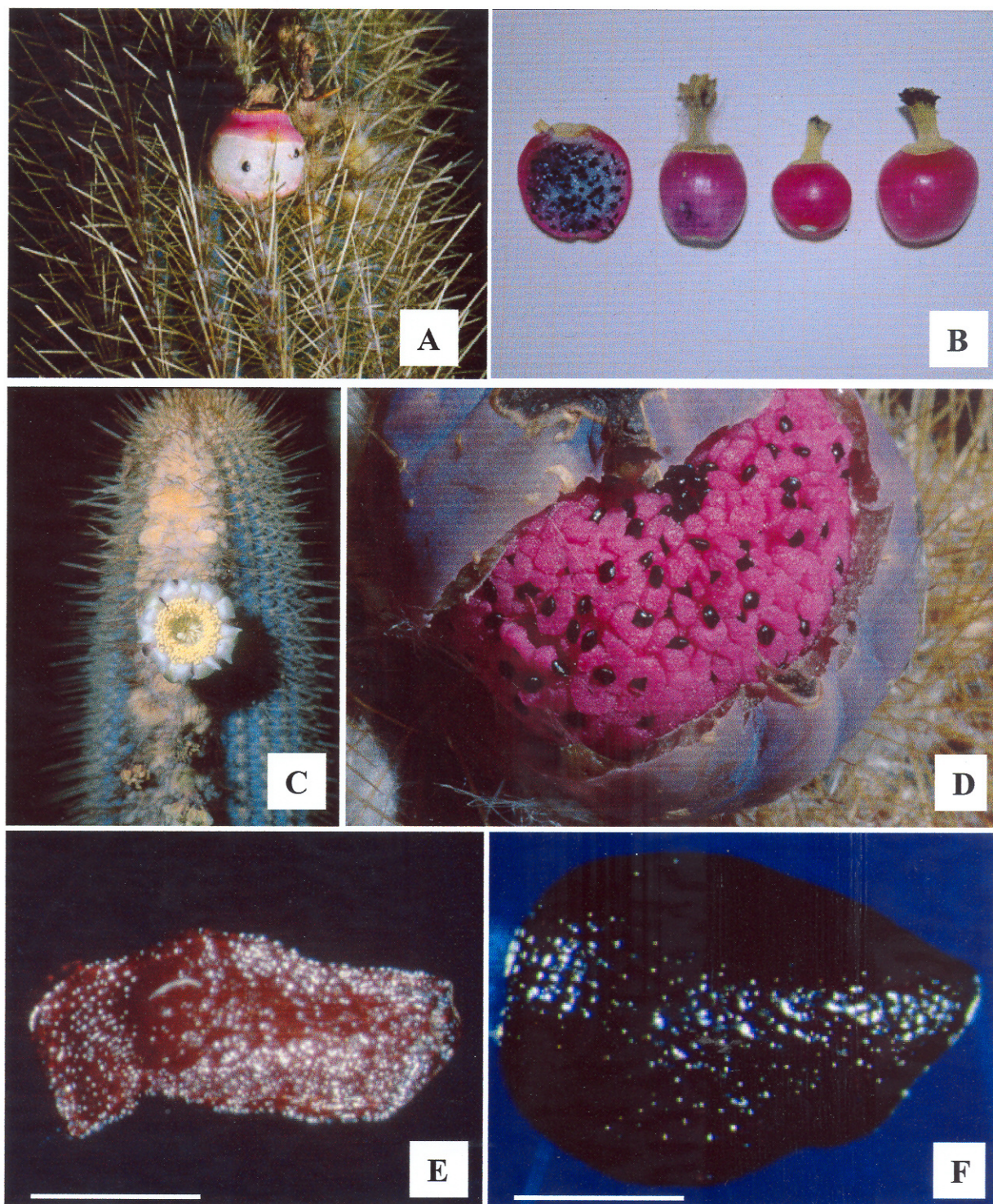


Figura 7: (A) Fruto deiscente de *Micranthocereus auriazureus*, note a polpa funicular de coloração branca. (B) Frutos de *M. purpureus* mostrando formas que variam de globosos a depresso-obovais, note os restos florais acastanhados. (C) Flor de *M. estevesii*, note o segmentos do perianto externo reflexos durante a antese. (D) Fruto de *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, note a polpa funicular vinácea. (E) Semente de *M. dolichospermaticus*, note a coloração marrom e o formato alongado (escala: 1mm). (F) Semente de *M. streckeri*, note a coloração negra (atrofusca) e o formato suborbicular, constante nas demais espécies de *Micranthocereus* (escala: 0,5mm).

Caráter 13. Período da antese. Várias inferências têm sido feitas sobre o modo de polinização das espécies de Cactaceae pertencentes à subfamília Cactoideae, com alguns poucos estudos realizados (vide capítulo 2). Durante observações realizadas no campo e a partir de material em cultivo, verificou-se que *Micranthocereus purpureus*, *Micranthocereus estevesii*, *Micranthocereus albicephalus* e *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* são espécies que apresentam antese predominantemente noturna (0), fechando-se completamente até o meio dia (12 horas). Acredita-se que *Micranthocereus dolichospermaticus* apresente comportamento semelhante a *Micranthocereus estevesii* pela semelhança na morfologia floral entre essas duas espécies. Foi observada apenas uma única flor desta espécie no campo e verificou-se que no horário de 11 horas da manhã já estava completamente murcha. As flores de *Micranthocereus flaviflorus* e *Micranthocereus streckeri* abrem-se à noite, porém a antese é predominantemente diurna (1) (mais informações no capítulo 2). Flores de *Micranthocereus auriazureus* e *Micranthocereus violaciflorus* foram observadas em campo completamente abertas no horário entre 12 e 13 horas. Para *Micranthocereus polyanthus* esse caráter foi codificado como (1) pela semelhança das flores com *Micranthocereus flaviflorus*. Como não foram observadas flores de *Coleocephalocereus goebelianus*, esse caráter foi codificado como '?' para esta espécie.

Caráter 14. Ápice do fruto. Foram observados dois estados de caráter facilmente distintos através de corte longitudinal em frutos provenientes de material coletado no campo. Este caráter também foi usado em estudo da tribo Cereeae (Taylor & Zappi 1989). Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus*, no ápice do fruto o pericarpo é plano (0), de onde saem os restos florais do perianto. Nas espécies de *Micranthocereus* o ápice do pericarpo é côncavo (1) formando uma cavidade envolvida pelos restos florais. Em *Micranthocereus purpureus*, o ápice do fruto se apresentou nas duas formas e por isso foi codificado

como polimórfico. Não foi possível obter informações de literatura e nem observar frutos no campo para *Micranthocereus albicephalus*, *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* e, por isso, este caráter foi codificado como '?'.
 ?

Caráter 15. Posição dos segmentos do perianto externo durante a antese. Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus* os segmentos do perianto externo durante a antese ficam reflexos (0), assim como em algumas espécies de *Micranthocereus*. Apenas *Micranthocereus violaciflorus* possui segmentos eretos (1). *Micranthocereus flaviflorus* possui tanto segmentos do perianto externo durante a antese reflexos quanto eretos, sendo codificado esse caráter como polimórfico. Esse caráter foi estudado em campo e também em indivíduos coletados e cultivados em casa de vegetação. Esse material foi de grande importância, pois algumas informações só foram obtidas através desse material em cultivo, como em *Micranthocereus estevesii* (Fig. 7C). Por não ter sido observada flores durante o período de antese para *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus polyanthus* e nem obtida informação na literatura, essas espécies foram codificadas como '?'.
 ?

Caráter 16. Presença de polpa funicular. A polpa funicular é derivada de tecido funicular do óvulo e sua consistência pode variar entre as espécies. Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus*, a polpa funicular está presente (0), assim como na maioria das espécies de *Micranthocereus*. Apenas *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* não apresentam sementes com polpa funicular (1). Esse caráter foi estudado, principalmente a partir de observações de material coletado e mantido em cultivo.
 ?

Caráter 17. Coloração da polpa funicular. A coloração e forma da polpa funicular podem variar fortemente dentro da família (Taylor & Zappi 1986). Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, a polpa é vinácea (0) (Fig. 7D) e nas demais espécies a polpa, quando presente, tem coloração branca (1) (Fig. 7A).

Caráter 18. Consistência da parede do fruto. Segundo Braun & Esteves (2001), quase todos os representantes brasileiros da família Cactaceae possuem frutos tipo baga, tendo o mesocarpo carnoso e a consistência da parede do fruto carnosa (0). Este fruto carnoso ocorre em vários gêneros, incluindo *Pilosocereus*, *Coleocephalocereus* e *Micranthocereus*. Apenas em *Micranthocereus dolichospermaticus* e *M. estevesii* ocorre um tipo fruto totalmente diferente (Braun & Esteves 1990). Segundo estes autores, essas espécies possuem fruto seco (1), apresentando um epicarpo papiráceo. Esse caráter pode ser observado em *Micranthocereus estevesii* a partir de material em cultivo.

Caráter 19. Deiscência do fruto. Frutos deiscentes por fenda irregular transversal na parede do pericarpelo (0) é uma característica de *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* (Fig. 7D). Em *Coleocephalocereus goebelianus* o fruto é circunciso na base (1). Cabe aqui salientar que na literatura este caráter para o gênero *Coleocephalocereus* está muitas vezes descrito como “fruto abrindo por um poro basal” (Barthlott & Hunt 1993, Taylor 2000), mas achamos correto adotarmos a deiscência circuncisa na base (1). Nas espécies de *Micranthocereus* os frutos são indeiscentes (2). Através de material cultivado em casa de vegetação foi possível verificar que o fruto de *Micranthocereus estevesii* também é circunciso na base (1). Braun & Esteves (1990) inferem que os frutos de *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* teria abertura no ápice pela queda dos remanescentes florais. Entretanto, esse caráter não pode ser observado com segurança para *Micranthocereus dolichospermaticus* e foi codificado como '?'. Também através de indivíduos de

Micranthocereus auriazureus coletados e cultivados em casa de vegetação foi possível verificar que esta espécie possui frutos deiscentes por uma fenda irregular transversal (Fig. 7A) e por isso, esta espécie foi codificada como (0). Esse caráter foi considerado 'não ordenado', por não ser perceptível uma direção na transformação dos caracteres.

Caráter 20. Coloração dos restos do tubo floral e dos segmentos do perianto. Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, a coloração dos restos do perianto é negra (0). Cabe aqui salientar que este caráter foi utilizado por Taylor (2000) na subdivisão dos três subgêneros de *Micranthocereus*. Segundo esse autor, as espécies pertencentes ao subg. *Micranthocereus* apresentariam restos do perianto de coloração acastanhada (1). Ainda segundo Taylor (2000), as espécies incluídas no subg. *Austrocephalocereus* apresentariam coloração dos restos do tubo floral e dos segmentos do perianto negra. Todas as espécies de *Micranthocereus* foram observadas em campo, entretanto, verificou-se que *Micranthocereus albicephalus* (Fig. 4B) e *Micranthocereus purpureus* (Fig. 7B) podem apresentar restos do perianto tanto de coloração negra como acastanhada, apresentando portanto, polimorfia para este caráter. Para *Coleocephalocereus goebelianus* esse caráter também foi codificado como '?' por não terem sido observadas flores desta espécie e também não ter sido obtida informação de literatura.

Caráter 21. Forma do pericarpelo. Backeberg (1938) descreveu o gênero *Austrocephalocereus* incluindo espécies que foram posteriormente sinonimizadas a *Micranthocereus* por Ritter (1979). Uma das características florais utilizadas por Backeberg para separar *Austrocephalocereus* de *Micranthocereus* foi a presença de pericarpelo depresso globoso. Porém, este caráter varia amplamente entre as espécies de *Micranthocereus* aqui analisadas. *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* possui pericarpelo depresso globoso (0), assim como *Micranthocereus violaciflorus*,

Micranthocereus albicephalus e *Micranthocereus auriazureus*. As espécies *Micranthocereus dolichospermaticus*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus streckeri* possuem pericarpelo superficialmente obtriangular, delimitado a partir do tubo floral (1). *Micranthocereus purpureus* apresentou flores contendo pericarpelo depresso globoso a superficialmente obtriangular, assim como *M. flaviflorus* e por isso esse caráter foi codificado como polimórfico. O mesmo foi considerado para *Coleocephalocereus goebelianus* e *Micranthocereus polyanthus* por não terem sido observadas flores e nem obtida informação de literatura.

Caráter 22. Forma da semente. Todas as espécies aqui analisadas possuem sementes suborbiculares (Fig. 7F) (0), apenas em *Micranthocereus dolichospermaticus* (Figs. 7G e 6E) a semente apresenta-se alongada com região hilo-micropilar expandida (1).

Caráter 23. Coloração da semente. A coloração da semente depende da espessura e pigmentação da testa, mas também pode ser influenciada pela escultura da superfície celular (Barthlott & Hunt 2000). Em *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, *Coleocephalocereus goebelianus* e na maioria das espécies de *Micranthocereus* as sementes são de coloração negra (atrofusca) (0) (Fig. 7F). Apenas *Micranthocereus dolichospermaticus* apresenta semente de coloração acastanhada (1) (Fig. 7E). Taylor (2000) descreve as sementes de *Micranthocereus polyanthus* de coloração marrom-escura a negra (atrofusca), entretanto foram observadas apenas sementes marrom-escuras. Consideramos os dois estados, e por isso foi codificado como polimórfico.

Caráter 24. Ângulo formado da região hilo-micropilar em relação ao corpo da semente. Em vista lateral, a região hilo-micropilar pode estar situada perpendicularmente à semente, formando um ângulo reto em relação ao corpo da

semente (0) ou formando ângulo oblíquo (1) em relação à semente (Figs. 6E e 7A). *Micranthocereus polyanthus* e *M. purpureus* apresentam a região hilo-micropilar formando ângulo reto a levemente oblíquo em relação ao corpo da semente sendo esse caráter considerado polimórfico para estas duas espécies.

Caráter 25. Formato das células da testa em vista superficial. O contorno das células da testa em vista superficial pode se apresentar sob duas formas definidas: células isodiamétricas (0) (Figs. 7B e 7C) ou alongadas (1), como ocorre apenas em *Micranthocereus dolichospermaticus* (Fig. 8H).

Caráter 26. Presença de crateras nas junções entre as células. Entre as células tectais observam-se comumente profundas depressões (“pits”), conhecidas apenas para família Cactaceae e que podem fundir-se formando “crateras”. A presença de depressões na testa é um caráter amplamente distribuído na subfamília Cactoideae, excluindo a tribo Cacteae e, não ocorre em outra família de angiospermas (Barthlott & Hunt 2000). *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* e *Coleocephalocereus goebelianus* (fig 7I), espécies utilizadas como grupo externo não apresentam essas depressões (0), assim como a maioria das espécies de *Micranthocereus* (Figs. 7C, 7E, 7F e 7H), enquanto que três espécies de *Micranthocereus* apresentam crateras (1) na junção entre essas células (Figs. 7B e 7D).

Caráter 27. Escultura da superfície celular da testa. Observando-se a superfície das células da testa, verificam-se dois padrões principais, que variaram amplamente dentro das espécies analisadas. Os estados de caráter encontrados foram superfície lisa (Figs. 7C, 7F e 7H) (0) e superfície finamente estriada (Figs. 7B, 7D, 7E e 7I) (1).

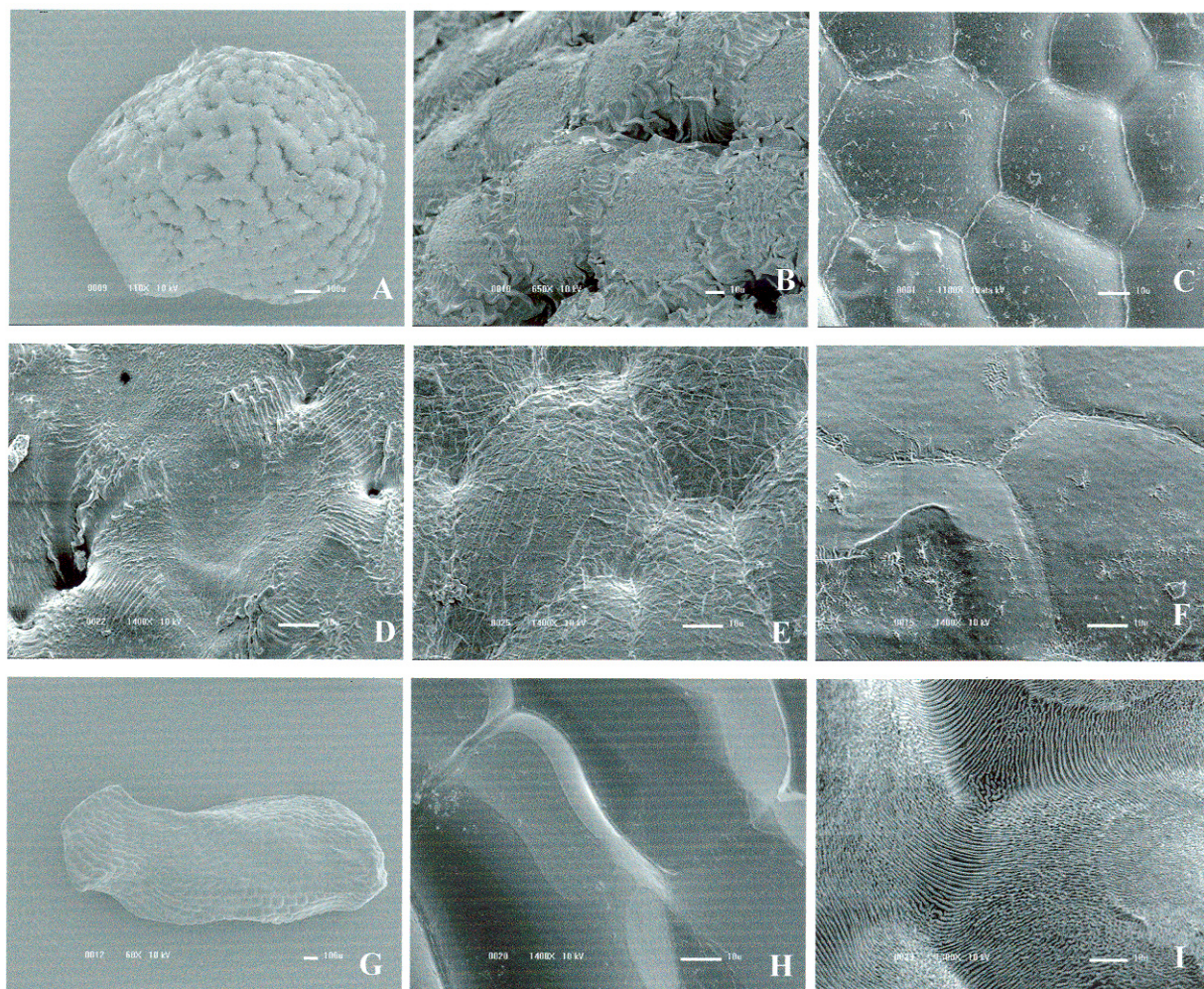


Figura 8. Sementes. (A-B) *M. violaciflorus*. (A) vista geral do formato suborbicular (escala: 100 μ m), (B) células tectais evidenciando crateras entre essas células e superfície finamente estriada (escala: 10 μ m). (C) *M. estevesii*. Células da testa isodiamétricas (escala: 10 μ m). (D) *M. purpureus*. Células da testa fracamente convexas evidenciando crateras entre essas células e superfície finamente estriada (escala: 10 μ m). (E) *M. streckeri*. Células da testa fracamente convexas evidenciando ausência das crateras entre essas células (escala: 10 μ m). (F) *M. polyanthus*. Superfície celular da testa lisa, sem crateras, paredes periclinais planas (escala: 10 μ m). (G-H) *M. dolichospermaticus*. (G) formato alongado da semente (escala: 100 μ m), (H) detalhe das paredes periclinais das células da testa fracamente convexas, superfície lisa, sem crateras (escala: 10 μ m). (I) *Coleocephalocereus goebelianus*. Detalhe das paredes periclinais fortemente convexas, superfície finamente estriada (escala: 10 μ m).

Caráter 28. Paredes periclinais das células da testa. *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri*, *Micranthocereus flaviflorus*, *Micranthocereus purpureus* (Fig. 8D), *M. streckeri* (Fig. 8E) e *Micranthocereus dolichospermaticus* (Fig. 8H) apresentam paredes periclinais fracamente convexas (0). *Coleocephalocereus goebelianus* (Fig. 8I) e algumas espécies de *Micranthocereus* apresentam paredes fortemente convexas (1). Apenas *Micranthocereus auriazureus* e *Micranthocereus polyanthus* (Fig. 8F) apresentam parede periclinais planas (2). Aqui, este caráter também foi considerado 'não ordenado'.

ANÁLISES CLADÍSTICAS

Estatística das árvores: dados estatísticos para cada análise realizada estão na Tab.

4. Os valores mostrados consistem nos números de caracteres incluídos na matriz, número de caracteres filogeneticamente informativos, número de árvores igualmente mais parcimoniosas encontradas, comprimento (número de passos) da árvore, índices de consistência, índices de retenção e número de clados sustentados a partir das análises de 'bootstrap' na árvore de consenso.

Tab. 4. Valores e análises estatísticas realizadas a partir do programa PAUP de caracteres separados e combinados.

Matriz	<i>trnL-F</i>	Morfologia	Dados combinados
Nº de caracteres incluídos na matriz	740	29	768
Nº de caracteres variáveis e parcimoniosamente não-informativos	56	6	62
Nº de caracteres filogeneticamente informativos	16	23	38
Nº de árvores	3465	1	1
Nº de passos	87	52	141
Índice de consistência (CI)	0,920	0,615	0,816
Índice de retenção (RI)	0,632	0,636	0,623
Nº de clados com 'bootstrap' >85% em árvores de consenso	1	1	1

Análise cladística baseada em caracteres morfológicos. Das análises realizadas com o auxílio do programa PAUP 4.0 β 10 foi gerada uma única 1 árvore, com 54 passos, RI = 0,573 e CI = 0,614 (tab. 4). A figura 9A representa a única árvore obtida na análise “branch and bound”, mostrando os caracteres morfológicos mapeados no cladograma. As espécies pertencentes a *Micranthocereus* formam um grupo parafilético, pois *Coleocephalocereus* está cladisticamente incluído em *Micranthocereus*. Nesta análise, *Coleocephalocereus goebelianus* é o grupo irmão das espécies de *Micranthocereus*, excluindo o subg. *Siccobaccatus*. Este grupo é sustentado pelos caracteres: expulsão ativa dos frutos do cefálio (caráter 5) e superfície celular rugosa da testa da semente (caráter 27, com uma reversão). O subgênero *Siccobaccatus* é sustentado pelas seguintes apomorfias: crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas da base (caráter 3), frutos obpiriformes (caráter 10), secos (caráter 18), com polpa funicular ausente (caráter 16) e pericarpelo de formato superficialmente obtriangular em corte longitudinal(caráter 21). Foi feita uma análise de ‘bootstrap’ (Fig. 9B), reduzindo consideravelmente a resolução interna e apenas o ramo formado pelas espécies *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* mostrou-se bem sustentado, com 92% de ‘bootstrap’. A maioria dos ramos colapsou, indicando um baixo número de caracteres sustentando os clados e também um alto índice de homoplasias nos caracteres morfológicos. O clado formado por *Coleocephalocereus goebelianus* e algumas das espécies de *Micranthocereus* não permanece quando se realiza a análise de ‘bootstrap’. O caráter 5 (expulsão ativa dos frutos do cefálio) havia sido considerado com sendo restrito às espécies de *Melocactus* e *Coleocephalocereus* (Taylor & Zappi 1989). Entretanto, através de observações em campo e de material cultivado, foi possível verificar que algumas das espécies de *Micranthocereus* também apresentam esta característica. Como nunca foi observado para *Micranthocereus violaciflorus* e *Micranthocereus auriazureus*, *Micranthocereus*

albicephalus e *Micranthocereus polyanthus*, esse caráter precisa ser melhor investigado, pois um melhor acompanhamento da época de frutificação dessas quatro espécies pode mostrar-nos se há possibilidade ou não de expulsão de frutos. Caracteres de semente variaram amplamente entre as espécies de *Micranthocereus*, não indicando uma relação entre elas, o que é observado pelo caráter 27, onde também ocorre reversão em um clado que inclui três espécies (Fig. 9A).

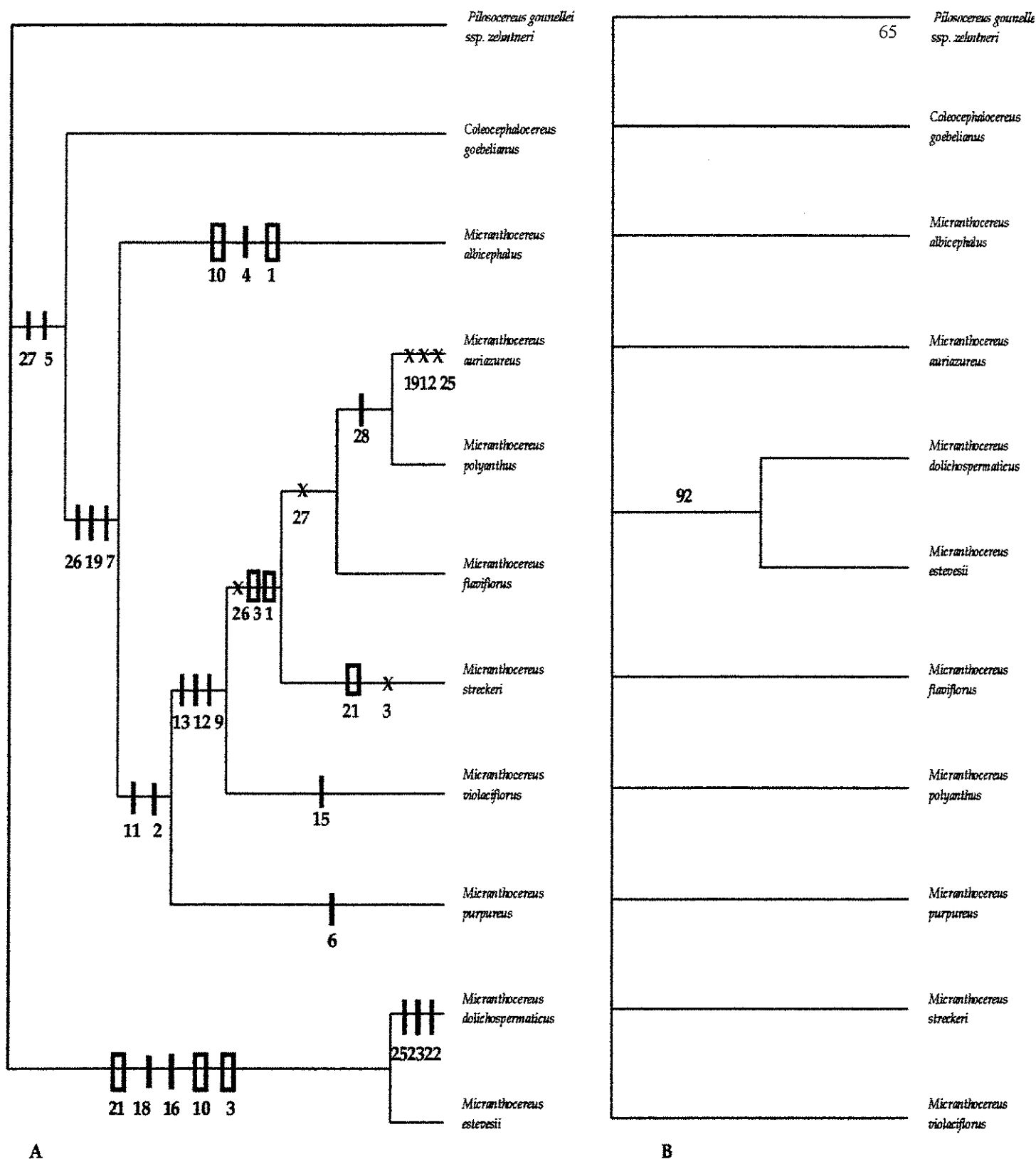


Figura 9: (A) Árvore mais parcimoniosa obtida a partir da análise de dados morfológicos, com os dados mapeados nos respectivos ramos. (B) Árvore de 'bootstrap'. Apenas valores de 'bootstrap' acima de 50% foram apresentados. (X = reversão, □ = paralelismo)

Análise cladística baseada em caracteres moleculares (região *trnL-F*). A matriz de *trnL-F* consiste de 740 posições, das quais 668 são constantes, 56 são variáveis e 16 são potencialmente informativas para a filogenia do grupo. A partir das análises realizadas com o auxílio do programa PAUP 4.0 β 10 foram geradas 3465 árvores igualmente parcimoniosas, com 87 passos, RI = 0,632 e CI = 0,920 (tab. 4). O baixo valor do índice de retenção (0,632) reflete um alto grau de autapomorfias encontrado nas espécies estudadas. Apesar da árvore de consenso estrito ser pouco resolvida (Fig. 10A), *Coleocephalocereus goebelianus* forma um clado com *Micranthocereus purpureus* (fracamente sustentado, com valores de 'bootstrap' baixos ('bootstrap' = 53%), mostrando relações entre *Coleocephalocereus* e *Micranthocereus* indefinidas, o que está de acordo com os resultados obtidos a partir de dados morfológicos. O clado formado por *Pilosocereus gounellei* subsp. *gounellei* e *Pilosocereus gounellei* subsp. *zehntneri* é bem sustentado com valor de 'bootstrap' = 96%. Com os resultados dessa análise, *Melocactus conoideus* aparece como grupo irmão de *Pilosocereus gounellei*, porém esta relação não tem um suporte elevado ('bootstrap' = 61%). As relações dos clados obtidos com *Pilosocereus aurisetus* subsp. *aurisetus*, *Coleocephalocereus fluminensis* e o restante das espécies de *Micranthocereus* parecem não resolvidas (Fig. 10A). A Fig. 10B representa uma das 3465 árvores de *trnL-F* obtida a partir da análise 'branch and bound'. Foi feita uma análise de comprimentos dos ramos a partir de *trnL-F* e verificou-se que os taxa terminais mostram um alto grau de autapomorfia (Fig. 11).

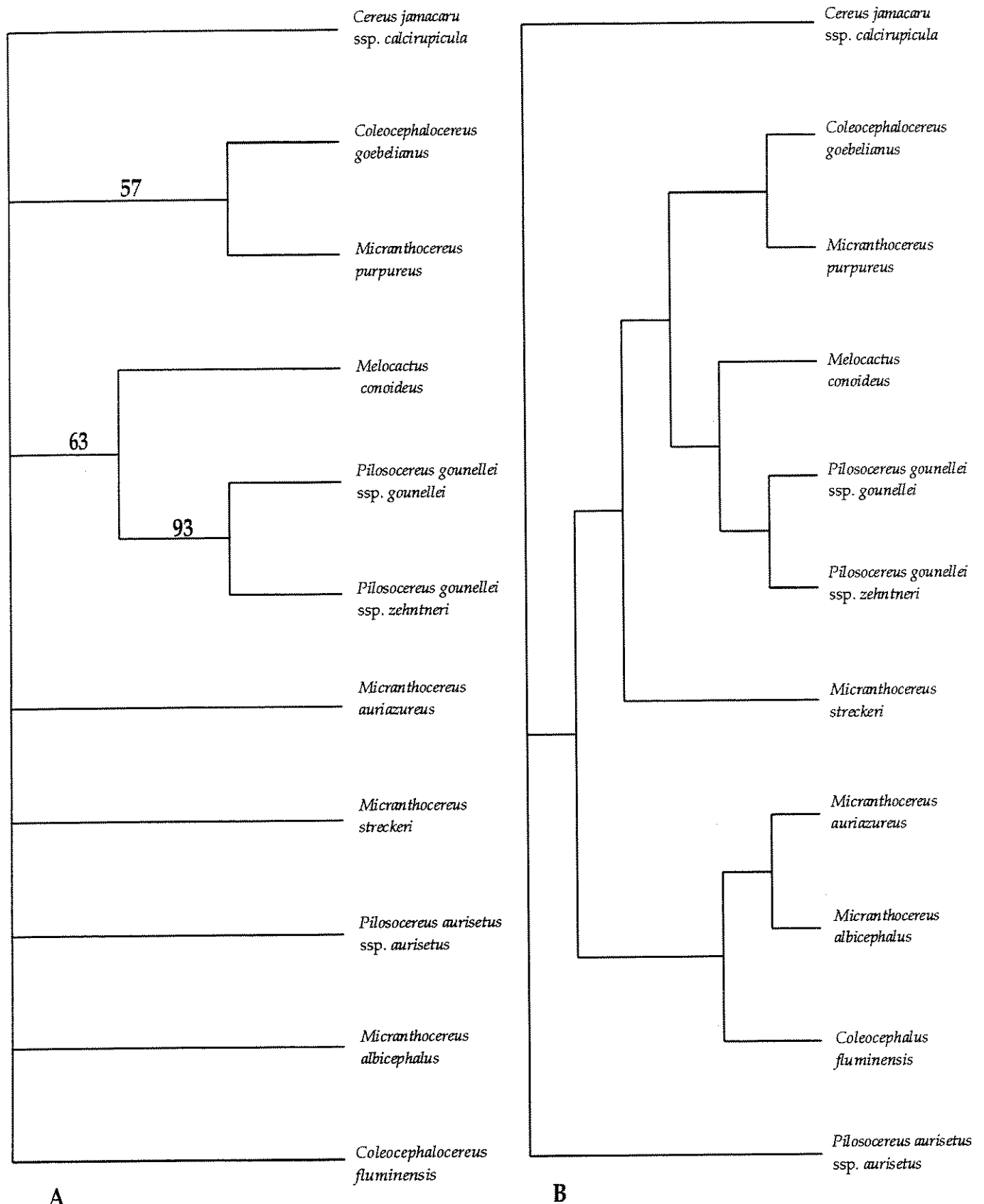


Figura 10. (A) Árvore de consenso estrito obtida a partir da análise de *trnL-F*. Apenas valores de 'bootstrap' superiores a 50% foram apresentados. (B) Uma das 3465 árvores mais

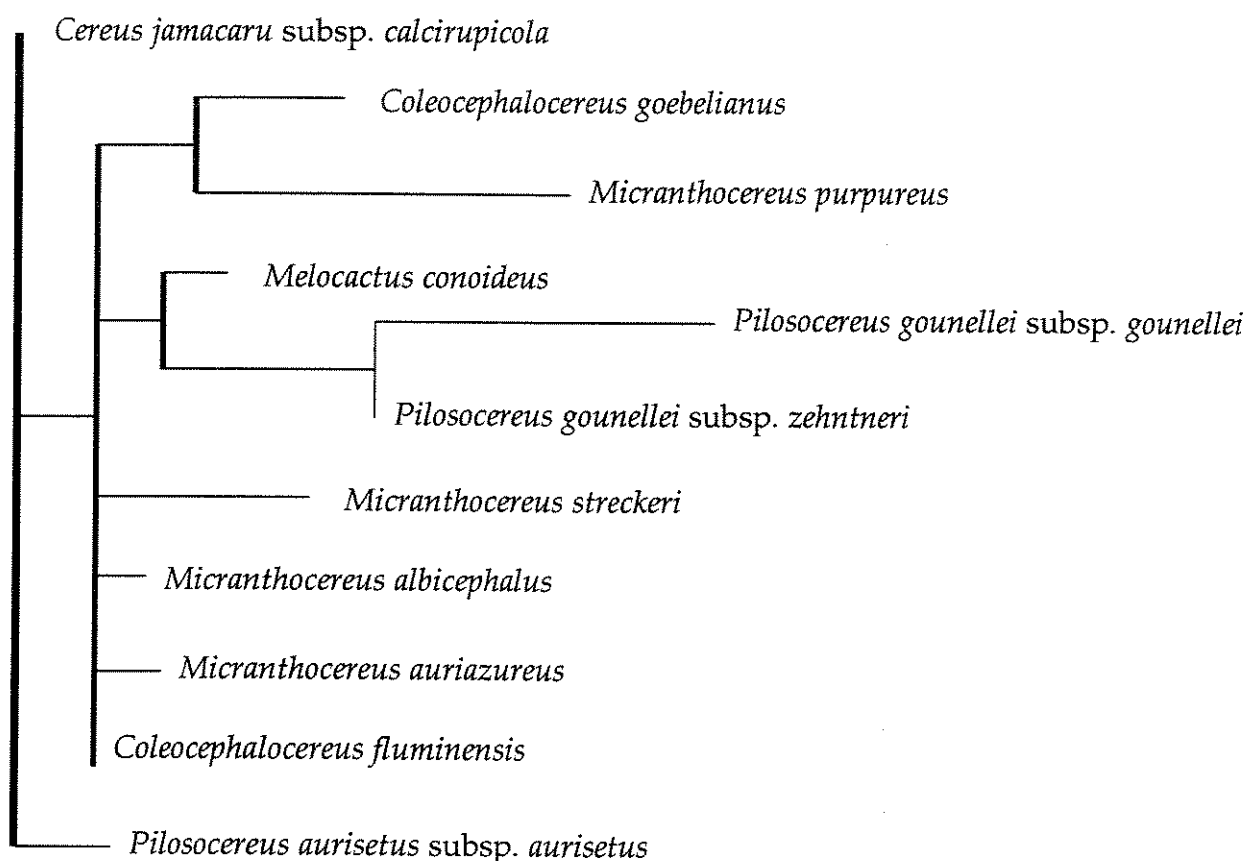


Fig. 11. Filograma obtido a partir da análise de *trnL-F* mostrando o comprimento dos ramos, indicando o alto grau de autapomorfias nos taxa estudados.

Análise molecular (*trnL-F*) utilizando *Austrocactus bertinii* como grupo externo.

Foi realizada também uma análise (Fig. 11A) utilizando-se *Austrocactus bertinii* como grupo externo para verificar a posição do gênero *Cereus* juntamente com as outras espécies da tribo Cereeae. Para isso, utilizou-se seqüências obtidas a partir de Nyffeler (2002) para as espécies *Parodia magnifica* (Ritter) F. H. Brandt e *Austrocactus bertinii* (E. Cels ex Hérincq) Britton & Rose, ambas pertencentes à tribo Notocactaeae. *Cereus jamacaru* subsp. *calcirupicola* forma um clado fracamente suportado ('bootstrap' = 72%) e sua posição continua semelhante a apresentada na figura 10A, assim como as relações de *Micranthocereus* e *Coleocephalocereus*. Nesta análise, foram utilizados 778 caracteres macromoleculares, sendo 688 constantes, 23 são potencialmente informativos e 67 variáveis e não informativos. Foram obtidas 5005 árvores com 110 passos, CI = 0,909 e RI = 0,643.

Análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares. Na análise combinada de dados, 768 caracteres foram incluídos, dos quais 668 são constantes, 62 variáveis e não informativos e 38 filogeneticamente informativos. Como apresentado na tab. 4, foi encontrada apenas 1 árvore mais parcimoniosa com 141 passos e $CI = 0,816$ e $RI = 0,623$. Os resultados obtidos através da árvore de consenso para teste de 'bootstrap' foram muito semelhantes aos da análise de *trnL-F*. A árvore de consenso estrito obtida a partir da análise combinada de dados também não confirma o monofiletismo do gênero *Micranthocereus*, o que é mostrado pela presença do clado formado por *Micranthocereus purpureus* e *Coleocephalocereus goebelianus* sustentado por "bootstrap" igual a 59% (Fig. 11B) e pelo clado formado pelas espécies *Micranthocereus albicephalus* e *Coleocephalocereus fluminensis* sustentado por 'bootstrap' igual a 73%. O teste de 'bootstrap' mostra a relação entre os gêneros e as espécies de *Micranthocereus* não resolvida, resultando uma politomia na árvore de consenso.

Devido algumas divergências encontradas entre a árvore de consenso utilizando-se apenas dados de *trnL-F* (Fig. 10) e a árvore de dados combinados (Fig. 12), foi realizado o teste de "Partition Homogeneity" (Farris *et al.* 1995). Este teste verifica se a divisão dos caracteres utilizados na análise combinada tem significado filogenético diferente, ou seja, se eles são ou não congruentes uns com os outros. Nesta análise, foi obtido um valor de $P < 0,05$ indicando que os dados morfológicos e macromoleculares utilizados na análise combinada não são congruentes, e por isso, não podem ser analisadas em conjunto.

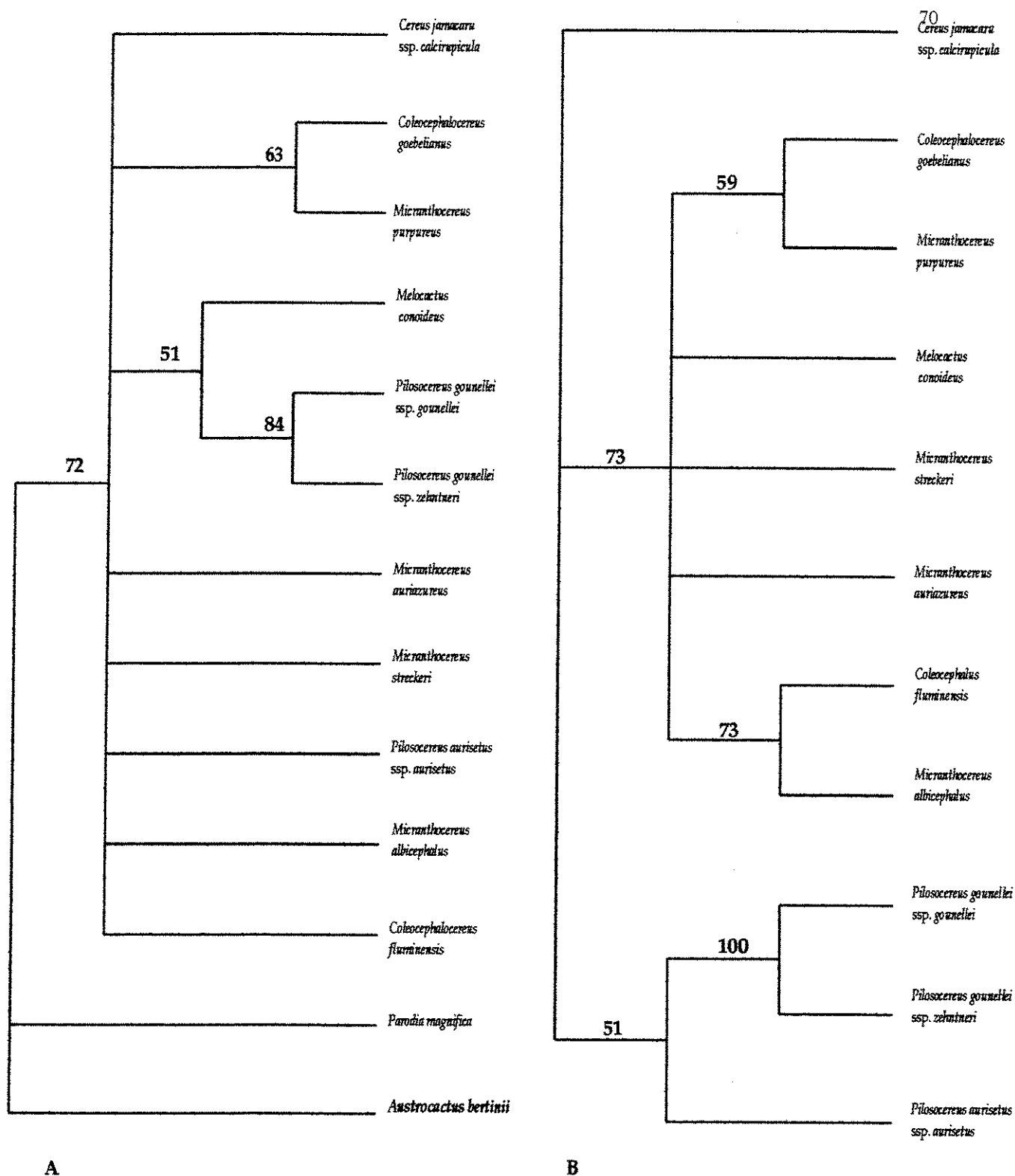


Figura 12: (A) Árvore de consenso estrito obtida a partir de dados de *trnL-F* utilizando-se *Austrocactus bertinii* como grupo externo. (B) Árvore de 'bootstrap' obtida a partir de dados combinados. Foram apresentados valores de 'bootstrap' superiores a 50%.

DISCUSSÃO

Nos cladogramas obtidos através das análises cladísticas com caracteres morfológicos e moleculares, o gênero *Micranthocereus* não aparece como um grupo monofilético. Isto é indicado pela exclusão de *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* na análise morfológica e pela presença de *Coleocephalocereus goebelianus* inserido dentro do gênero tanto na análise morfológica como molecular.

A árvore mais parcimoniosa obtida a partir da análise morfológica indica a formação de dois clados principais, um deles com *Coleocephalocereus goebelianus* como grupo irmão de uma parte das espécies de *Micranthocereus* e um segundo clado formado por *M. dolichospermaticus* e *M. estevesii*. Porém, o único clado fortemente sustentado é o formado pelo subg. *Siccobaccatus* que apresenta 'bootstrap' igual a 92%. O clado formado por *Coleocephalocereus* e o restante das espécies de *Micranthocereus* não é bem sustentado por testes de 'bootstrap'.

Micranthocereus estevesii e *Micranthocereus dolichospermaticus* são espécies pertencentes ao subg. *Siccobaccatus* e muito semelhantes entre si, formando um clado terminal sustentado por alguns caracteres, como fruto obpiriforme, seco, com polpa ausente (caracteres 10, 16 e 18 respectivamente) e pela presença de crescimento exacerbado dos espinhos basais (caráter 3). *M. dolichospermaticus* é endêmico de uma área restrita do oeste da Bahia, ocorrendo próximo ao Rio São Francisco, sobre afloramentos de calcário Bambuí cercados por caatinga ou floresta com elementos de caatinga. *M. estevesii* é a única espécie que ocorre fora do centro de diversidade das espécies de *Micranthocereus* (Fig. 2). É uma espécie endêmica de Goiás e Tocantins (Taylor 2000) e também ocorre em afloramentos de calcário Bambuí, como *M. dolichospermaticus*. Estas duas espécies foram consideradas por

Braun & Esteves (1990) pertencentes ao gênero *Siccobaccatus* e, apesar de ocorrerem em áreas disjuntas, são espécies extremamente semelhantes e as únicas dentro de *Micranthocereus* que ocorrem em ambientes de afloramentos de calcário Bambuí. Estes afloramentos de calcário são ambientes de origem pré-cambriana, como vegetação característica da caatinga e freqüentemente ocorrem como pontos isolados (Braun & Esteves Pereira 2001). Com os dados obtidos até o momento, as espécies *M. dolichospermaticus* e *M. estevesii* parecem ser espécies bastante distintas do restante das espécies pertencentes ao gênero *Micranthocereus*, confirmando as idéias propostas por Braun & Esteves (1990), de serem estas espécies pertencentes ao gênero *Siccobaccatus*. Esperamos que estudos moleculares que serão finalizados, possam elucidar melhor a relação destas duas espécies com as demais espécies de *Micranthocereus*.

Na análise de dados moleculares, *Coleocephalocereus* forma um clado juntamente com *Micranthocereus purpureus*. Infelizmente, não foi possível a amplificação do segmento *trnL-F* para *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii*, para verificar a posição destas espécies em relação a *Coleocephalocereus* e as espécies de *Micranthocereus*. Estes resultados corroboram a dificuldade em encontrar um caráter que represente uma sinapomorfia para o gênero *Micranthocereus*. Os caracteres utilizados na matriz de dados morfológicos, apesar de serem importantes na caracterização das espécies de *Micranthocereus*, também estão presentes em outros gêneros pertencentes à tribo Cereeae.

Segundo Taylor (2000), *Coleocephalocereus* é um gênero formado por 6 espécies endêmicas dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia. Ocorrem entre as ambientes de caatinga (3 espécies) e mata atlântica (5 espécies), sendo quase exclusivamente associado com a ocorrência dos chamados 'inselbergs' de gnaiss e granito. Ainda segundo Taylor (2000), o gênero é caracterizado por

apresentar hábito geralmente com ramificação a partir da base ou ramificação basal ausente, cefálio lateral, sempre aprofundado, fruto turbinado (=obpiriforme), expulso pelo cefálio quando maduro.

As espécies do subg. *Siccobaccatus*, *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii*, apresentam alguns caracteres morfológicos aparentemente semelhantes a algumas espécies de *Coleocephalocereus*, como por exemplo, a própria espécie utilizada no presente estudo, *Coleocephalocereus goebelianus*. Estas espécies apresentam em comum o cefálio sempre aprofundado e contínuo e presença de crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas basais. Ocorrem como plantas unicaules e robustas (apresentando caules com diâmetro maior que 30cm) e possuem flores tubulares, maiores que 4cm comprimento. Curiosamente, *M. dolichospermaticus* e *M. estevesii* não ficaram próximas de *Coleocephalocereus goebelianus* no cladograma obtido através da análise morfológica (Fig. 9A). Ambas as espécies ficaram na base da árvore, mostrando suas posições ainda indefinidas. Não foi possível obter seqüências do segmento *trnL-F* para as espécies *M. dolichospermaticus* e *M. estevesii* (subg. *Siccobaccatus*) e verificar sua relação com o gênero *Coleocephalocereus*.

Em *Micranthocereus*, as espécies que apresentam flores relativamente semelhantes e de tamanho pequeno, até 2,2cm de comprimento, são *Micranthocereus streckeri*, *Micranthocereus polyanthus*, *Micranthocereus violaciflorus* e *Micranthocereus flaviflorus*. Entretanto, estas espécies diferem amplamente na coloração dos segmentos externos do perianto, como por exemplo, *M. flaviflorus*, que possui flores com segmentos externos do perianto laranja-avermelhados a levemente róseos e *M. streckeri* com segmentos externos do perianto róseos intenso ('pink'). Alguns dos caracteres morfológicos incluídos na análise cladística estão presentes em apenas uma das espécies citadas acima, representando autapomorfias, como por exemplo, o cefálio contínuo ocorrendo apenas em *M.*

streckeri, ou presença de segmentos do perianto externo eretos durante a antese e sementes com crateras entre as junções das células, ocorrendo somente em *M. violaciflorus*.

Os resultados obtidos a partir de ambas as análises realizadas são semelhantes. As relações entre as espécies de *Micranthocereus* e entre os gêneros estudados permanecem indefinidas, representadas por politomias nos cladogramas. O segmento de DNA aqui investigado não foi suficientemente informativo para possibilitar a inferência de relações interespecíficas com segurança. Foram feitas tentativas de amplificação com espaçadores internos de transcrição do DNA ribossomal nuclear (ITS), mas são regiões de difícil amplificação, fato também verificado por P. Soffiati e M. W. Chase (com. pess.).

Na análise de *trnL-F* foi verificado que poucos caracteres moleculares variáveis eram filogeneticamente informativos (tab. 4). Uma possível explicação para esse resultado seria que a especiação tenha ocorrido rapidamente, passando-se muito tempo sem que houvesse ocorrido algum outro evento de especiação, o que foi observado pela análise de comprimentos de ramos (Fig. 11). Nesta análise, os ramos mais basais são extremamente curtos, com poucos caracteres existentes nestes ramos, revelando uma especiação rápida. Os ramos terminais apresentam-se extremamente longos, o que sugere que ao longo do tempo, os táxons teriam acumulado muitos caracteres (autapomorfias). O mesmo resultado foi verificado para espécies do gênero *Luxemburgia* (Ochnaceae) localizados em campos rupestres da Cadeia do Espinhaço (Feres 2000).

Os resultados aqui obtidos impossibilitam qualquer inferência para o gênero *Micranthocereus* em relação à evolução de caracteres morfológicos. Os resultados obtidos apresentam o gênero como sendo parafilético, entretanto sua relação com o

gênero *Coleocephalocereus* é indefinida. Este gênero, segundo Taylor (2000), apresenta como sinapomorfia a deiscência dos frutos que se dá por uma circuncisão basal, porém esse caráter parece estar presente em *M. dolichospermaticus* e *M. estevesii*. A partir desses resultados parece-nos prematuro sugerir qualquer mudança taxonômica para o gênero *Micranthocereus*.

CONSIDERAÇÕES FITOGEOGRÁFICAS

A Serra do Espinhaço, a principal cadeia montanhosa do Planalto Central a leste do Brasil, é constituída por dois blocos principais, a Chapada Diamantina, no Estado da Bahia, e a Cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais, com altitude variando entre 700 a 2000m (Harley 1995). Ainda segundo Harley (1995), essas áreas montanhosas são comparáveis a ilhas, separadas umas das outras por condições ecológicas diferentes das existentes em terras baixas, atuando como barreiras para migração e resultando num sistema com características adaptativas que possibilitam o estabelecimento e sucessos ecológicos da fauna e da flora em ambiente de altitude.

O gênero *Micranthocereus* ocorre em apenas quatro Estados brasileiros. Dentro destes Estados, o gênero apresenta uma distribuição ainda mais restrita. A maior parte do gênero aparentemente só ocorre nos campos rupestres do Estado de Minas Gerais e na Chapada Diamantina (BA), com apenas uma espécie em afloramentos a oeste da Bahia e outra em Goiás e Tocantins.

As duas espécies incluídas no subgênero *Siccobaccatus*, *Micranthocereus estevesii* e *Micranthocereus dolichospermaticus*, apesar de estarem distribuídas em Estados diferentes (*M. estevesii* ocorre na BA e *M. dolichospermaticus*, em GO e TO), elas

ocorrem no mesmo tipo de afloramento rochoso, os afloramentos de calcário do grupo Bambuí. Estas duas espécies são muito próximas, diferindo principalmente no seu tamanho e na forma e escultura das sementes. Os locais de ocorrência destas espécies podem representar locais onde possa ter ocorrido dispersão a longa distância, isolamento e especiação para estas duas espécies.

O maior número de espécies ocorre na Bahia (5 espécies). Campos rupestres são formações ocorrentes principalmente em altitudes acima de 800m, caracterizados por vegetação subarbustiva e herbácea em solo arenoso-pedregoso e arbustiva e herbácea em ilhas de afloramentos rochosos de quartzito, arenito ou canga (Giulietti & Pirani 1988, Borba & Semir 1998). O clima nessas áreas de campo rupestre é do tipo 'Cwb', segundo a classificação de Köppen (1948). Devido à descontinuidade das formações montanhosas e destes afloramentos rochosos, muitas espécies ocorrentes em campos rupestres, especialmente as rupícolas, estão distribuídas em populações disjuntas. Esta característica pode ser responsável pela grande diversidade e elevado grau de endemismo dos campos rupestres, considerado um dos maiores tipos vegetacionais do Brasil (Joly 1970, Giulietti & Pirani 1988).

A maioria das espécies de *Micranthocereus* é endêmica de apenas uma localidade, como por exemplo, *Micranthocereus streckeri*, ocorrendo apenas em Seabra (BA), *Micranthocereus auriazureus* e *Micranthocereus violaciflorus*, na região de Grão Mogol (MG) ou *Micranthocereus polyanthus*, ocorrendo nos arredores de Caetité (BA), apresentando nestes locais apenas uma ou duas populações. Segundo Semir (1991), estes ambientes rupestres da Cadeia do Espinhaço, com topografia acidentada, clima e solos citados anteriormente, proporcionam condições ecológicas para uma especiação intensa. Desta forma, pode-se ter o isolamento de

espécies e a conseqüente formação de um complexo rupestre com um alto grau de endemismo (Semir 1991, Giulietti & Pirani 1988).

Micranthocereus purpureus é a única espécie com distribuição mais ampla, ocorrendo não apenas em um único local como a maioria das espécies de *Micranthocereus*, mas em afloramentos ao longo de toda a Chapada Diamantina (de Rio de Contas até Morro do Chapéu). Esta espécie geralmente apresenta populações maiores, com grande densidade de indivíduos em relação as demais. Esta foi a única espécie que apresentou polimorfismo entre populações em alguns caracteres como, por exemplo, a coloração dos tricomas lanosos presentes nas aréolas do cefálio, coloração da epiderme do caule e formato e tamanho dos frutos. Espécies restritas a um único local, às vezes a uma única população, como *Micranthocereus streckeri*, também chamadas de microendêmicas (Giulietti & Pirani 1988, Semir 1991), apresentaram geralmente morfologia mais uniforme.

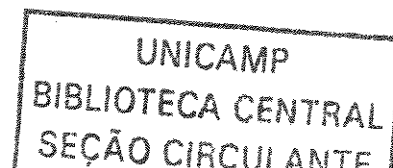
Caracteres pouco discutidos para o gênero, como os de sementes, foram aqui revistos e complementados. Caracteres importantes do gênero, como hábito e frutos, foram melhor observados em campo e através de material em cultivo, com exceção de *Micranthocereus polyanthus*, do qual não foi possível observar caracteres florais durante o presente trabalho e as informações das parte florais foram obtidas a partir de literatura. Caracteres considerados diagnósticos por Taylor (2000) no tratamento taxonômico e fitogeográfico das Cactaceae do nordeste do Brasil e por Barthlott & Hunt (1993) para *Micranthocereus* são extremamente variáveis dentro do gênero e às vezes dentro de uma mesma espécie. A análise de material vivo foi bastante útil no estudo dos caracteres morfológicos, especialmente porque houve a possibilidade de observar uma grande quantidade de material. Alguns dos caracteres considerados importantes por Taylor (2000) na subdivisão de *Micranthocereus* em subgêneros foram revistos e adicionadas novas informações,

como os de ramificação do caule, forma do fruto e coloração dos restos do perianto. Para uma melhor delimitação e posterior classificação das espécies atualmente incluídas neste gênero, conclui-se ser necessária a observação de um conjunto de caracteres como hábito, cefálio, forma e deiscência dos frutos.

Os resultados aqui obtidos podem servir como ponto de partida para uma reavaliação e uma posterior redelimitação taxonômica do gênero *Micranthocereus* e de gêneros proximamente relacionados. Estes dados mostram dificuldades encontradas no gênero e devem servir como subsídio para um posterior melhor entendimento do padrão de diversificação morfológica e ecológica de *Micranthocereus* e gêneros próximos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKER, F. T., CULHAM, A., GÓMEZ-ARTINEZ, R., CARVALHO, J., COMPTON, J., DAWTREY, R. & GIBBY, M. (2000). Patterns of nucleotide substitution in angiosperms cpDNA *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) regions. *Mol. Biol. Evol.* 17(8): 1146-1155.
- BARTHLOTT, W. & HUNT, D. 1993. Cactaceae: In: Kubitzki, K., Rohwer L. & Bittrich, V. (Eds.) *The families and genera of vascular plants*, Vol. II. Springer: Berlin, pp: 161-197.
- BARTHLOTT, W. & HUNT, D. 2000. Seed-diversity in the Cactaceae. Subfam. Cactoideae. Vol. 5. Succulent Plant Research.
- BORBA, E. L. & SEMIR, J. 1998. *Bulbophyllum* x *cipoensis* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian "campos rupestres": description and biology. *Lindleyana*. 13: 113-120.
- BRAUN, P. & ESTEVES PEREIRA, E. 1990. *Siccobaccatus* P. J. Braun et Esteves gen. nov. Een nieuw cactusgeslacht uit Brazilië. *Succulenta* 69 (1): 1-8.
- BRAUN, P. & ESTEVES PEREIRA, E. 2001. *Schumannia* 3. Kakteen und andere Sukkulente in Brasilien. Oldenburg: Isensee.
- FARRIS, J. S., KÄLLERSJÖ, M., KLUGE, G. A. & BULT, C. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics*. 10:315-319.
- FERES, F. 2000 (ined.). O gênero *Luxemburgia* A. St.-Hil. (Ochnaceae) - revisão taxonômica e estudo cladístico. Tese de Mestrado. Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.



- FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406-416.
- GIBSON, A. C. & NOBEL, P. S. 1986. *The cactus primer*. Harvard University Press: Cambridge, Mass.
- GIULIETTI, A. M. & PIRANI, J. R. 1988. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer, W. R. & Vanzolini, P. E. (Eds.) *Proceedings of a workshop of neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências. pp-39-69.
- HERSHKOVITZ, M. A. & ZIMMER, E. A. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46: 217-232.
- HUNT, D. 1999. *CITES Cactaceae checklist*. 2 Ed. Remous Limited, Milbourne Port.
- HUNT, D. R. & TAYLOR, N. P. 1990. The genera of Cactaceae: towards a new consensus. *Bradleya* 8: 85-107.
- JOLY, A. B. 1970. *Conheça a vegetação brasileira*. Edusp: São Paulo.
- KÖPPEN, W. 1948. *Climatologia com un estudio de los climas de la Tierra*. (Transl.: Peres, P. R. H.). Fono de Cultura Economica: Mexico.
- MADDISON, W. P. & MADDISON, D. R. 2000. *MacClade: analysis of phylogeny and character evolution, version 4.0*. Sinauser, Sunderland, Massachusetts.
- NYFFELER, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from *trnk/matK* and *trnL-trnF* sequences. *Am. J. Bot.* 89(2): 312-326.

- RADFORD, A. E., DICKISON, W. C., MASSEY, J. R. & BELL, C. R. 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row , Publishers: New York, Evanston, San Francisco, London.
- RITTER, F. 1979. Kakteen in Südamerika. Vol. 1. Spangenberg.
- SEMIR, J. 1991 (ined.). Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae). Tese de Doutorado. Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP.
- SWOFFORD, D. L (2002). PAUP: phylogenetics analysis using parsimony (and others methods), version 4.0 b 10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- TABERLET, P. L., GEILLY, G., PAUTOU, G. & BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification on three non-coding regions of chloroplast DNA. Pl. Molec. Biol. 17: 1105-1109.
- TAYLOR, N. P. 1991. *Micranthocereus*. In: Hunt, D. R. & Taylor, N. P. (Eds.) Notes on Miscellaneous genera of Cactaceae. Bradleya 9: 89.
- TAYLOR, N. P. 2000 (ined). Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of Eastern Brazil, Supplement 1 (Formal Taxonomic Treatment of the Cactaceae of Eastern Brazil). PhD Thesis. Open University, Milton Keynes.
- TAYLOR, N. P. & ZAPPI, D. C. 1989. An alternative view of generic delimitation and relationships in tribe Cereeae (Cactaceae). Bradleya 7: 13-40.
- ZAPPI, D. C. 1994. *Pilosocereus* (Cactaceae): The genus in Brazil. Succulent Plant Research, vol. 3. Royal Botanic Gardens, Kew.

APÊNDICE 1. Protocolo para extração e precipitação do DNA, segundo kit extração Nucleon Phytopure

Lise da parede celular:

1. Tecido fresco: adicionar 3 volumes de nitrogênio líquido a 0,1g de tecido fresco (peso fresco) previamente congelado a -20°C ; moer e transferir para tubos de eppendorf numerados;
2. Adicionar 600 μl do reagente 1, assegurando-se que todos os ingredientes deste estão bem dissolvidos;
3. Adicionar 10 μl de RNase e incubar a 37°C por 30 minutos;
4. Misturar fortemente com pissetas plásticas (uma para cada amostra);
5. Adicionar 200 μl do reagente 2;
6. Inverter manualmente várias vezes os tubos até obter uma mistura homogênea;
7. Incubar a 65°C por 1 hora, agitando por inversão os tubos de 5 em 5 minutos;
8. Colocar as amostras em gelo por 20 minutos.

Extração do DNA:

1. Remover as amostras do gelo e adicionar 500 μl de clorofórmio gelado;
2. Adicionar 100 μl de resina (a resina deve conter volumes iguais de resina e tampão. Se necessário deixe a resina sedimentar a adicione tampão TE estéril. A resina deve ser ressuspendida imediatamente antes do uso por agitação vigorosa);
3. Misturar manualmente os tubos por inversão por 10 minutos;
4. Centrifugar por 10 minutos a 3.900 r.p.m. para separar as fases. O clorofórmio ficará abaixo da fase aquosa, contendo o DNA, acima (se a fase superior ficar verde nebulosa, dar um spin adicional de 7.000 r.p.m. por 5 minutos);

5. Pipetar e transferir a fase superior para um tubo novo previamente numerado. Não esquecer de medir o volume retirado, pois no próximo passo o volume de isopropanol vai depender do volume desta fase aquosa (descartar o clorofórmio em um recipiente apropriado);

Precipitação do DNA:

1. Adicionar volume igual em μl de isopropanol (2-propanol) gelado a fase aquosa;
2. Inverter os tubos manualmente delicadamente até o DNA precipitar. Caso não houver precipitado visível, deixar por 30 minutos no freezer a -20°C . Nesta fase, pode-se parar por 'overnight' em freezer ou então deixar a solução agitando vigorosamente por 3 horas;
3. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 r.p.m.;
4. Descartar cuidadosamente o sobrenadante (cuidado para o 'pellet' não cair);
5. Lavar o 'pellet' com 500 μl de etanol 70%;
6. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 r.p.m.;
7. Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
8. Colocar 500 μl de wash 1 em cada tubo e esperar 20 minutos;
9. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 r.p.m.;
10. Colocar 500 μl de wash 2 em cada tubo;
11. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 r.p.m.;
12. Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
13. Deixar secar no ar até todas as gotas do frasco secarem;
14. Ressuspender o DNA em 100 μl de tampão TE , deixando 'overnight' em freezer ou então deixar a solução agitando vigorosamente por 3 horas;

15. Correr um gel de agarose a 0,8% com solução de DNA extraído para checar a qualidade do DNA. Corar o gel em brometo de etídeo a visualizar sob luz U.V. e fotografar.

APÊNDICE 2. Protocolo utilizado no presente estudo pra amplificação da região do espaçador intergênico *trnL-F*.

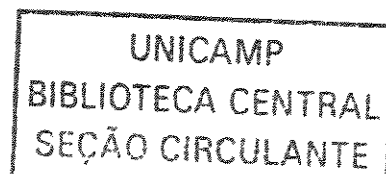
Solução Premix I (volumes referentes a uma amostra):

Tampão Promega	2,0 μ L
MgCl ₂ (2,5mM/L) Promega	1,6 μ L
Mix dNTPs	0,8 μ L
PVP 1%	2,0 μ L
Total	6,4 μ l

1. Preparar a solução (em gelo) Premix I em tubo de 1,5 ml com os reagentes (sempre calculando 1 amostra a mais para cada 10, para evitar erros de pipetagem):

Premix I	6,4 μ l
Primer <i>trnL</i> "c"	0,4 μ l
Primer <i>trnL</i> "f"	0,4 μ l
Água milliQ	10,7 μ l
<i>Taq</i> polimerase	0,1 μ l
Total	17,0 μ l

2. Com auxílio de um vórtice, agitar o tubo rapidamente para assegurar a completa mistura dos reagentes;
3. Pipetar 17,0 μ l da solução MIX em cada tubo devidamente numerado;
4. Adicionar 3,0 μ l de DNA em cada tubo numerado e fechar para evitar evaporação;
5. Organizar os tubos e colocar tudo na máquina de PCR;



6. O programa leva de 2:30 a 3 horas para terminar. Após o término colocar os tubos imediatamente em gelo ou no freezer;
7. Correr um gel de agarose 1,0% com produtos de PCR para checar sua qualidade. Corar o gel com brometo de etídeo e visualizar sob luz U.V.

APÊNDICE 3. Protocolo utilizado no presente estudo para purificação dos produtos de PCR

1. Numerar os tubos do Kit Quiaquick de acordo com a numeração das amostras e adicionar a coluna para filtração ao tubo.
2. Adicionar à coluna de filtração um volume de cinco vezes de tampão PB ao volume do produto de PCR.
3. Centrifugar a 13000 r.p.m. por cerca de 1 a 2 min.
4. Descartar o líquido que restou no final do tubo.
5. Adicionar 750µl de tampão PE.
6. Centrifugar a 13000 r.p.m. por cerca de 1 a 2 min.
7. Descartar o líquido que restou no final do tubo e centrifugar novamente a 13000 r.p.m. por 1 minuto.
8. Descartar o tubo e transferir a coluna para tubos de 1,5 ml (numerados).
9. Adicionar 30 µl de solução EB.
10. Centrifugar a 10000 r.p.m. por cerca de 1 a 2 min.
11. Descartar a coluna filtradora.
12. Correr um gel para verificar a qualidade e presença dos produtos de PCR.

APÊNDICE 4. Chave analítica para identificação das espécies de *Micranthocereus* baseada em Taylor (2000), modificada.

1. Plantas geralmente maiores que 3m, ramificação basal ausente, caule ereto; câmara nectarífera estreitamente elíptica (áfloramentos de calcáreo, sudoeste da Bahia e Goiás).
2. Plantas até 3m alt., segmentos externos do perianto alvos a levemente cremes, sementes alongadas, marrons, com borda do hilo expandida (afloramento de calcáreo, sudoeste da Bahia) *M. dolichospermaticus*
2. Plantas até 8m alt., segmentos externos do perianto levemente rosados a cremes com listas vináceas no ápice dos segmentos externos do perianto, sementes suborbiculares, negra (atrofusca)s (afloramento de calcáreo, Goiás) *M. estevesii*
1. Plantas até 0,3-2,5m quando adultas, caule geralmente ramificado a partir da base, raro ramificação basal ausente, caule decumbente; câmara nectarífera oval a depresso oval ou oboval a depresso oboval (afloramentos de quartzito, Cadeia do Espinhaço e Chapada Diamantina).
3. Flores maiores que 3x2cm, antese vespertina e predominantemente noturna, cefálio sempre aprofundado no ramo apresentando abundantes tricomas lanosos alvos, acinzentados, amarelados, marrom-pálidos com manchas rosadas.
4. Cefálio com tricomas lanosos das aréolas floríferas alvos a amarelados, costelas 23-29(-32), epiderme verde brilhante, ausência de tricomas nas aréolas vegetativas; segmentos externos do perianto levemente esverdeados a alvo-rosados, tubo floral creme (Serra do Espinhaço, norte de Minas Gerais e extremo sul da Bahia) **1. *M. albicephalus***
4. Cefálio com tricomas lanosos das aréolas floríferas alvos ou marrom-claros com manchas rosadas ou acinzentadas, costelas (10-)12-16, epiderme verde-acinzentada

ou glauca, presença de tricomas nas aréolas vegetativas; segmentos externos do perianto profundamente purpúreo, segmentos internos alvos com leves manchas rosadas no ápice; tubo floral purpúreo (Chapada Diamantina) 5. *M. purpureus*

3. Flores mais delgadas, menores que 2,3x1,1cm, antese vespertina e predominantemente diurna, cefálio superficial, raro aprofundado no ramo, tricomas pouco abundantes.

5. Ausência de crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas basais, cilindro vascular lenhoso; espinhos centrais e cerdas das aréolas vermelho-escuros a castanho; frutos maduros verdes; sementes com paredes periclinais das células da testa fortemente convexas, apresentando crateras nas junções entre as células ("Serra da Bocaina", região de Grão Mogol, Minas Gerais) 7. *M. violaciflorus*

5. Presença de crescimento exacerbado dos espinhos das aréolas basais, cilindro vascular do caule predominantemente não lenhoso, raro lenhoso (*M. flaviflorus*); espinhos e cerdas das aréolas na sua maioria dourados ou amarelo-claros, frutos maduros vermelhos ou róseos; sementes com paredes periclinais das células da testa fracamente convexas a planas, não apresentando crateras nas junções entre as células (Serra de Grão Mogol, Chapada Diamantina)

6. Caule 3-5,5cm diâm., ereto a mais ou menos inclinado ou decumbente; flores até 2,2cm compr., presença de tricomas nas aréolas vegetativas; segmentos externos do perianto laranja-avermelhados a róseo-pálidos.

7. Planta muito ramificada na base, flores com segmentos externos do perianto laranja-avermelhados a levemente róseos; paredes periclinais das células da testa fracamente convexas; sementes sempre negra (atrofusca)s (Norte da Bahia, Municípios de Morro do Chapéu a Sento Fé) 3. *M. flaviflorus*

7. Planta pouco ramificada na base, flores com segmentos externos do perianto púrpuro-claros; paredes periclinais das células da testa lisas; sementes negra (atrofusca)s a castanho-escuras (Sul da Bahia, Município Caetité) . 4. *M. polyanthus*

6. Caule 5,5-7,0cm diâm., ereto; flores 2-3cm compr., ausência de tricomas nas aréolas vegetativas; segmentos externos do perianto róseos intenso ou levemente róseos.

8. Cefálio superficial, descontínuo; com tricomas lanosos alvos a acinzentados; flores com segmentos externos do perianto róseo-claros; fruto rosa-claro, não apresentando expulsão ativa do fruto do cefálio; sementes com células da testa planas a levemente convexas (Grão Mogol, Minas Gerais) **2. *M. auriazureus***

8. Cefálio superficial a aprofundado, contínuo; com tricomas lanosos dourados ou acastanhados; flores com segmentos externos do perianto róseo intenso, fruto purpúreo, apresentando expulsão ativa do fruto do cefálio; sementes com células da testa convexas (Bahia, Oeste de Seabra) **6. *M. streckeri***

CAPÍTULO 2 - POLLINATION BIOLOGY OF TWO BRAZILIAN ENDEMIC *MICRANTHOCEREUS* BACKEB. (CEREAEAE, CACTOIDEAE) SPECIES

INTRODUCTION

The family Cactaceae Juss. forms a monophyletic group (Wallace & Cota 1996) that includes approximately 100 genera with 1300 species distributed in the New World (Barthlott & Hunt 1993). Eastern Brazil presents the third main geographical center of diversity of the family (Zappi 1994, Taylor 2000).

Cactaceae species present a wide range of floral features as regards shape, colour, size, odour, time of anthesis and position of the reproductive parts, which allow the pollination by several groups of biotic agents (Hunt & Taylor 1990, Vogel 1990), like medium (Mcfarland *et al.* 1989) and large bees (Viana *et al.* 2001), sphingids and other moths (Suzan *et al.* 1994, Holland & Fleming 1999), hummingbirds (Scobell & Scott 2002), bats (Ruiz *et al.* 1997, Tschapka *et al.* 1999), or even the pollination by nocturnal and diurnal vectors in the same species, as hummingbirds and bats (Fleming *et al.* 1996, Sahley 2001). According to Vogel (1990), around 9% of the species of Cactaceae are pollinated by hummingbirds. Other studies on Cactaceae species also reported various reproductive strategies like self-compatibility (Bianchi *et al.* 2000) and self-incompatibility (Boyle 1996, Metz *et al.* 2000), as well as the presence of sexual and asexual reproduction in the same species (Mandujano *et al.* 1998, Negron-Ortiz 1998).

The genus *Micranthocereus* Backeb. (Cereaeae, Cactoidaeae) includes nine species distributed in Minas Gerais, Bahia, Goiás and Tocantins states of Brazil. The studies concerning the reproductive biology of Brazilian Cactaceae species recorded melithophily in *Opuntia* (Schlindwein & Wittmann 1995, 1997), sphingophily in *Cereus* (Silva & Sazima 1995) and *Selenicereus* (Barthlott *et al.* 1997),

ornitophily in *Melocactus* and *Opuntia* (Locatelli & Machado 1999b, Raw 1996), and chiropterophily in *Pilosocereus* (Locatelli *et al.* 1997). However, no data are available on the reproductive biology of *Micranthocereus* species.

The objectives of this study are to investigate and compare the pollination biology of two Brazilian endemic *Micranthocereus* species, *Micranthocereus flaviflorus* Buining & Brederoo and *Micranthocereus streckeri* van Creek & van Criel.

MATERIAL AND METHODS

STUDY SITE AND SPECIES STUDIED

The study was conducted between July and August 2001 in the Chapada Diamantina (Bahia state, NE Brazil), a mountain complex belonging to the “Cadeia do Espinhaço” that spreads ca. 1000km from NE to SE Brazil (700 to 2000m alt.) and presents a large diversity of Cactaceae species (Machado 1999, Taylor 2000). The studied population of *Micranthocereus flaviflorus* presented 15 individuals located on Morro do Chapéu (10°50’S-12°00’S and 40°40’W-41°30’W). The plants grow in sandy soil in an area occupied by transitional vegetation including ‘cerrado’ (tropical shrub to tree savanna), ‘campo rupestre’ (rocky savanna) and ‘caatinga’ (deciduous low thorny forest). The population of *Micranthocereus streckeri*, including 40 individuals, was located upon rocks in an area with ‘campo rupestre’ vegetation, surrounded by forest areas, being endemic to the study area, located in Seabra (12°25’52S and 41°59’36W).

The phenology of both species studied were based mainly in herbaria specimens.

FLORAL MORPHOLOGY AND BIOLOGY

Floral lifespan and events were recorded for a population of each species. Fresh flowers of both species were randomly collected in a minimum of five individuals/species, fixed in FAA 50 and stored in alcohol 70%. These flowers were used for the illustrations, which were made using a stereomicroscope equipped with a camera Lucida, and for floral measurements (flower-tube length and diameter, 32 flowers/species), which were obtained with a digital calliper (error, 0.01 mm). The measurements were compared between species with a Student's *t* test (Sokal and Rohlf 1981).

Nectar concentration and volume were estimated in the afternoon (ca. 24h after the beginning of the anthesis), on flowers bagged in pre-anthesis stage (*n*=12 flowers for *Micranthocereus flaviflorus* and *n*=10 for *Micranthocereus streckeri*, five individuals for both), using micro-syringes and a pocket refractometer, respectively. Data were compared between species using a Student's *t* test (Sokal and Rohlf 1981).

Floral visitors were determined through direct observations in the field, in a total of 10 h for *Micranthocereus flaviflorus* and 40 h for *Micranthocereus streckeri*. Time and duration of visiting bouts were recorded, as well as the visitors behavior on the flowers, such as contact with anthers and stigma, type of floral resource collected and interactions with other visitors. For detecting possible nocturnal pollination, flowers were tagged in the afternoon of the day before and examined in the early morning. No direct nocturnal observations were undertaken. Pollinator importance was determined based on their frequency of visits and visiting behavior. The hummingbirds were identified in the field and using photographs taken during their visits and compared with illustrations in Grantsau (1988) and Ruschi (1982). Insect visitors were collected and identified as far as possible

through comparison with specimens deposited in the Universidade Estadual de Campinas Museum (ZUEC).

Voucher specimens were deposited in the Universidade Estadual de Campinas Herbarium (UEC; L.Y.S. Aona *et al.* 838 for *Micranthocereus flaviflorus* and L.Y.S. Aona *et al.* 810 for *Micranthocereus streckeri*).

RESULTS

FLORAL BIOLOGY AND MORPHOLOGY

The plants of both species are columnar, branched at the base, with decumbent or erect stems and flexible, golden to pale golden spines.

Micranthocereus flaviflorus flowered from May to August and produced fruits from July to November, whereas *Micranthocereus streckeri* produced flowers between June and August and fruits between August to November. The plants of both species have a fertile zone constituted by a lateral, superficial to sunken cephalium with flower-bearing areoles, which have white to yellowish hairs with long, pale to brownish golden bristles in *M. flaviflorus* (Fig. 1B), and compact, white to brownish hairs and long, pale golden to reddish brown bristles in *M. streckeri* (Figs. 1E e 1F).

Flowers of *Micranthocereus flaviflorus* are reddish pink with bract-scales at the apex and have perianth segments spreading to erect, orange-red to reddish pink; the inner segments opens very slightly and are yellow to pale cream (Fig. 1A). The stamens are close together and included within the flower-tube (with a lower row of stamens bent towards the style), and the stigma-lobes are 4–6, also included within in the flower tube (Fig. 2A). Flowers of *Micranthocereus streckeri* are deep pink with bract-scales at the apex, outer perianth segments spreading and deep pink, the inner perianth segments erect and purplish pink (Fig. 1F). The flowers of both species are tubular. Similarly to *M. flaviflorus*, in *M. streckeri* the stamens are positioned close

together forming a compact mass in the interior of the flower-tube, and both the anthers and the stigma-lobes are included within the flower-tube, (Fig. 2B). Flower length of *M. flaviflorus* ($12.3 \pm 0.1\text{mm}$, mean $\pm$ SE) was smaller than that of *M. streckeri* ($13.1 \pm 1.2\text{mm}$, mean $\pm$ SE, $t=-2.618$, $P=0.01$, $n=32$ for both), whereas the diameter was similar ($1.8 \pm 0.2\text{mm}$ for *M. flaviflorus*, $1.8 \pm 0.9\text{mm}$ for *M. streckeri*, mean $\pm$ SE, $t=-1.593$, $P>0.01$, $n=32$ for both, Fig. 4).

Flowers of both species started opening late afternoon, lasting around 36 hours, wilted at morning of the second day. In the newly opened flower the stigma-lobes are closed and only the pollen is liberated. Between the end of the first day and beginning of the second day of the anthesis, the stigma-lobes spread. The stigma-lobes become receptive in the first day of the anthesis.

The flowers of both species present a nectariferous chamber with a nectary inside the base of the flower-tube, where the nectar is produced and accumulated (Fig. 2A, B). Nectar volume was similar between the two species studied, whereas the concentration of sugar was higher in *Micranthocereus flaviflorus* (Table 1). The flowers of both species were scentless and offered nectar and pollen as rewards to floral visitors.

POLLINATION PROCESS

The main floral visitors of *Micranthocereus flaviflorus* were males and females of the hummingbird *Chlorostilbon aureoventris* Boucier & Mulsant (Fig. 1A), which were observed along the day, mainly in the morning, until 14 h (Fig. 3A), when they visited the flowers in regular intervals of approximately 10-30 min. Males of *C. aureoventris* were the principal pollinators of *M. flaviflorus* in the study site. *C. aureoventris* have a straight bill ($19.09 \pm 2.1\text{mm}$ length) that contacted the anthers and the stigma when collecting floral nectar. This hummingbird prevented the visit

of others individuals of the same species from the defended clump, a behavior that may be characterized as territorialistic (Feinsinger 1978, Stiles 1981). During the study period, females of *C. aureoventris* were seldom observed visiting the flowers of *M. flaviflorus*, and, when seen, they visited only sporadically and not over regular periods as observed at the males. When a male individual detected the presence of the female in the territory, it immediately chased it away.

The butterfly *Phoebis philea* Johansson (Fig. 1B) was another occasional floral visitor of *Micranthocereus flaviflorus*, being generally observed during the hottest hours of the day (12:00 to 15:00h). By collecting nectar it contacted the sexual parts of the flowers, thus acting as a pollinator. *Trigona spinipes* bees were observed mainly from 10:30 to 11:00h and from 14:00 to 17:00h, collecting pollen directly from the anthers, often damaging them. These bees were not observed contacting the stigma, however was observed that bees destroyed the anthers.

Similarly as observed in *Micranthocereus flaviflorus*, flowers of *Micranthocereus streckeri* were visited mainly by the hummingbird *Chlorostilbon aureoventris* (Fig. 1C, D). Females were more frequently observed however than males. The hermit hummingbird *Phaethornis squalidus* Temminck and some insects, as Hesperidae butterfly, the work bees *Apis mellifera* and *Trigona spinipes*, and even ants were observed as floral visitors of *M. streckeri*. The principal pollinator of *M. streckeri* are females of *C. aureoventris* that visit flowers along the day. The visits start about 6:00 h and stop approximately 17:00 h when the last visits were observed. The visits occurred at regular intervals. In the morning, the visits are more frequent and occur in intervals of approximately 30 min, rarely up to 60 min. In the afternoon the visits are more sparse and, at the end of the day, they took place in intervals of 1 h 10 min, approximately. Females of *C. aureoventris* behaved as territorialists mostly during the morning defending clumps from other visitors, like males of the same species and *P. squalidus* (Fig. 1E). The territorialist behaviours alternated with

trap-lining feeding strategy occurs in *C. aureoventris*. *Phaethornis squalidus* was observed visiting flowers of *M. streckeri* sporadically and only in the late afternoon. This hermit hummingbird visits principally the plants located in lower regions, in individuals close to valley, around 500m near the studied population. Probably the nectar resources that *P. squalidus* explores along the day become reduced late on the day and eventually it explores resources of *C. aureoventris* during the period when visits of *C. aureoventris* are becoming rare. All hummingbirds species acted as pollinators and received pollen grains on the bill.

For both species of *Micranthocereus*, the visits by both species of hummingbird to each flower were brief, lasting approximately two seconds each.

Some insects, like non-identified HesperIIDae (Lepidoptera) species (Fig. 1F), occasionally visited flowers of *M. streckeri* along the day and, similarly to the observed for *Phoebis phillea* on *M. flaviflorus* flowers, collected nectar and sometimes touched the anthers and the stigma with their proboscis, being considered occasional pollinators. *Apis mellifera* bees were observed on flowers of *M. streckeri* mainly in the morning, when they visited more than one flower of each individual, or even flowers of the same cephalium, landing at the apex of the floral-tube and collecting pollen directly from the anthers and sometimes causing anther damage, thus acting mainly as pollen robbers. Apparently these bees collect large amounts of pollen from the flowers, and occasionally contact the stigma and the anthers with the thorax and the abdomen, thus seldom performing legitimate pollination.

As observed in *Micranthocereus flaviflorus* flowers, *Trigona spinipes* was also observed visiting flowers of *Micranthocereus streckeri* at the same period of the day, and presenting similar behavior. Other occasional visitors were some non-identified ants, beetles and caterpillar species, which were observed cutting (ants) and eating (beetles and caterpillars) floral parts.

In both *Micranthocereus* species studied the trap-lining feeding strategy of *Chlorostilbon* was alternated with the territorialist behaviour. The occasional territorialist behaviour observed for male *C. aureoventris* in *Micranthocereus flaviflorus* and for females in *M. streckeri* occurred principally in the morning, when the visits were more frequent.

DISCUSSION

Most floral features of *Micranthocereus streckeri* and *Micranthocereus flaviflorus* are similar to those presented by species pollinated by hummingbirds in tropical communities, as easily accessible, diurnal and not-scented flowers with tubular and conspicuously colored flower tube and perianth segments, and a clear separation between floral resource (nectar) and sexual parts (Faegri and van der Pijl, 1979; Arizmendi and Ornelas 1990; Sazima *et al.* 1996; Buzatto *et al.* 2000, Castro & Oliveira 2001). Sugar concentration in the floral nectar of both species was also similar to those generally recorded in other ornitophilous species (Arizmendi and Ornelas 1990; Araújo 1996; Sazima *et al.* 1996; Buzatto *et al.* 2000; Castro & Oliveira 2001a), including Cactaceae (Scogin 1985). The analysis of nectar variation of some species of Cactaceae however, did not reveal a significant difference in sugar concentration of flower pollinated by hummingbirds, moths or bats, with values between 11-30%, 14-34% and 17-26%, respectively (Scogin 1985).

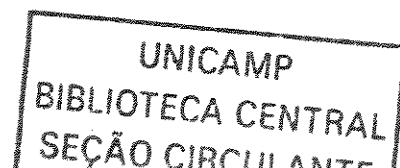
The short-tubed flowers of *Micranthocereus flaviflorus* and *Micranthocereus streckeri* allow the visits of hummingbirds with variable bill lengths, as those observed in this study only for the last species. Probably the absence of *Phaethornis squalidus* on *M. flaviflorus* flowers is related to the lack of forest habitats near the studied population, since this hummingbird is a typical pollinator of plants in this vegetation type (Stiles 1981; Buzato *et al.* 2000).

The decrease of *Clorostilbon aureoventris* visits to the flowers of *Micranthocereus flaviflorus* after 14:00h may be related to the presence of a sympatric Cactaceae species, *Melocactus paucispinus* Heimen. & R. J. Paul. Its flowers open approximately at 14:00h and were also visited by *C. aureoventris*.

Micranthocereus streckeri occurs sympatrically with other Cactaceae species, such as *Micranthocereus purpureus* (Gürke) Ritter, *Pilosocereus pachycladus* Ritter ssp. *pachycladus*, *Opuntia inamoena* Schum., *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* and *Stephanocereus luetzelburgii* (Vaup.) N. P. Taylor & Eggli and with members of other plant families also visited by the same hummingbird, like Apocynaceae and Bromeliaceae.

The visiting behaviour of *Chlorostilbon aureoventris* to the flowers of *Micranthocereus flaviflorus* and *Micranthocereus streckeri* reveals two types of feeding strategy: territoriality, in which the hummingbird delimits an area of food source composed of grouped plants, and defends that resource, and trapline behaviour. The last type of foraging favours cross-pollination promoting pollen dispersion among different individuals (Janzen 1971), whereas the territorial behaviour may reduce pollen flow in a population (Linhart 1973). The same behaviours, territorialist and trapline, were similar to that observed by Locatelli & Machado (1999b) by *C. aureoventris*.

It was observed in the populations of *Micranthocereus streckeri* that *Phaethornis squalidus* invades the territory of *Clorostilbon aureoventris* only in the afternoon. According Buzato *et al.* (2000), hermit hummingbirds are the major pollinators of hummingbird-pollinated floras in the forest of Brazil. *P. squalidus* visited the plants that occur near to the valley, closer to the forest area. This behaviour may be related with the diminishing resources in the afternoon, or with the longer time gaps between the visits of *C. aureoventris*.



Besides being apparently adapted for hummingbird pollination, pollen of the flowers of both species was frequently robbed and/or flower parts damaged by several insect species. As observed in other tropical communities, it seems that flowers of the studied species are clearly adapted for a bird/hummingbird pollen vector but a wide range of invertebrates, as butterflies and bees, also explores the resource (Buzato *et al.* 2000). The destructive behaviour of *T. spines* to flowers is known in other families, such as Passifloraceae (Sazima & Sazima 1998) and Melastomataceae (Renner 1983).

Bees are a very common pollen/nectar robbers in tropical (Castro & Oliveira 2001a) and temperate habitats, and generally present a similar behavior during their visits, *i.e.*, collecting nectar through holes inflicted at the base of the floral tube, and taking pollen directly from the anthers. Since the flowers of the species studied are deeply inserted within the cephalium, this feature avoids illegitimate access to nectar and no nectar robbing was observed.

Some cross pollination was attempted in green-house environment, which indicates that the investigated species of *Micranthocereus* are self-incompatible, though studies of the reproductive system will need to be carried out. Flowers of both species are protandric, thus probably favouring cross-pollination.

REFERENCES

- ARAÚJO, A. C. 1996. Beija-flores e seus recursos florais numa área de planície costeira do litoral norte de São Paulo. Unpubl. M. S. Thesis, Universidade Estadual de Campinas, SP, 69p.
- ARIZMENDI, M. C. & ORNELAS, J. F. 1990. Hummingbirds and their flower resources in a tropical dry forest in Mexico. *Biotropica* 22: 172-180.
- BARTHLOTT, W. & HUNT, D. 1993. Cactaceae: In: Kubitzki, K., Rohwer L. & Bittrich, V. (Eds.) The families and genera of vascular plants, Vol. II. Springer: Berlin, pp: 161-197.
- BIANCHI, M. B., GIBBS, P. E., PRADO, D. E. & VESPRINI, J. L. 2000. Studies on the breeding systems of understory species of a Chaco woodland in NE Argentina. *Flora* 195: 339-348.
- BOYLE, T. H. 1996. Characteristics of self-incompatibility in *Schlumbergera truncata* and *S. X buckleyi* (Cactaceae). *Sexual Plant Reproduction* 9: 49-53.
- BUZATO, S., SAZIMA, M. & SAZIMA, I. 2000. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites. *Biotropica* 32(4b): 824-841.
- CASTRO, C. C. & OLIVEIRA, P. E. 2001a. Reproductive biology of the protandrous *Fernandusa speciosa* Pohl. (Rubiaceae) in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 24: 167-172.
- _____.b. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Plant Biology* 5: 640-646.
- FEINSINGER, P. 1978. Community organization among neotropical nectar-feeding birds. *Amer. Zool.* 18:779-795.
- FAEGRI, K. & VAN DER PIJL, L. 1979. The principles of pollination ecology. Oxford: Pergamon Press.

- FLEMING, T. H., TUTTLE, M. D. & HORNER, M. A. 1996. Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of Sonoran Desert columnar cacti. *Southwestern Naturalist* 41: 257-269.
- GRANTS AU, R. 1988. Os beija-flores do Brasil. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura.
- HOLLAND, J. N. & FLEMING, T. H. 1999. Mutualistic interactions between *Upiga virescens* (Pyralidae), a pollinating seed-consumer, and *Lophocereus schottii* (Cactaceae). *Ecology* 80 (6): 2074-2084.
- HUNT, D. R. & TAYLOR, N. P. 1990. The genera of Cactaceae: progress towards consensus. *Bradleya* 8: 85-107.
- JANZEN, D. H. 1971. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.
- LINHART, Y. B. 1973. Ecological and behavioral determinants of pollen dispersal in hummingbird-pollinated *Heliconia*. *Am. Nat.* 107: 511-525.
- LOCATELLI, E., MACHADO, I. C. S. & Medeiros, P. 1997. Floral biology and pollination in the *Pilosocereus cattingicola* (Cactaceae) in Northeastern Brazil. *Bradleya* 15: 28-34.
- LOCATELLI, E. & MACHADO, I. C. S. 1999a. Floral biology of *Cereus fernambuscensis*: a sphingophilous cactus of restinga. *Bradleya* 17: 86-94.
- LOCATELLI, E. & MACHADO, I. C. S. 1999b. Comparative study of the floral biology in two ornithophilous species of Cactaceae: *Melocactus zehntneri* and *Opuntia palmadora*. *Bradleya* 17: 75-85.
- MCFARLAND, J. D., KEVAN, P. G. & LANE, M. A. 1989. Pollination biology of *Opuntia imbricata* (Cactaceae) in southern Colorado (USA). *Canadian Journal of Botany* 67(1): 24-28.
- MACHADO, M. C. 1999. The cacti of Morro do Chapéu, Bahia, Brazil. *BCSJ.* 17(4): 203-213.

- MANDUJANO, M. D. C, MONTANA, C., MENDEZ, I. & GOLUBOV, J. 1998. The relative contributions of sexual reproduction and clonal propagation in *Opuntia rastrera* from two habitats in the Chihuahuan Desert Journal of Ecology 86: 911-921.
- METZ, C., NERD, A. & MIZRAHI, Y. 2000. Viability of pollen of two fruit crop cacti of the genus *Hylocereus* is affected by temperature and duration of storage. Hortscience 35: 199-201.
- NEGRON-ORTIZ, V. 1998. Reproductive biology of a rare cactus, *Opuntia spinosissima* (Cactaceae), in the Florida Keys: Why is seed set very low? Sexual-Plant-Reproduction 11: 208-212.
- PORSCH, O. 1939. Cactaceae. In: Druck, J. (Ed.) Das bestäubungsleben der Kakteen-blüte, II. Neuman. (Jahrbucher der deutschen Kakteen-Gesellschaft eV.).
- RAW, A. 1996. Territories of the ruby-topaz hummingbird *Chrysolamps mosquitus* at flowers of the "turk's-cap" cactus, *Melocactus salvadorensis* in the dry caatinga of the north-eastern Brazil. Rev. Bras. Biol. 56: 581-584.
- RENNER, S. 1983. The widespread occurrence of anther destruction by *Trigona* bees in Melastomataceae. Biotropica 15: 581-584.
- RUIZ, A., SANTOS, M., SORIANO, P. J., CAVELIER, J., CADENA, A. 1997. Mutalistic relations between the bat *Glossophaga longirostris* and the columnar cacti in the arid region of La Tatacoa, Colombia. Biotropica 29: 469-479.
- RUSCHI, A. 1982. Aves do Brasil – Beija-flores. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura. Vol. 3-4.
- SAHLEY, C. T. 2001. Vertebrate pollination, fruit production, and pollen dispersal of *Stenocereus thurberi* (Cactaceae). Southwestern Naturalist 46: 261-271.

- SAZIMA, I., BUZATO, S. & SAZIMA, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Bot. Acta* 109: 149-160.
- SAZIMA, I. & SAZIMA, M. 1989. Mamangavas e irapuás (Hymenoptera, Apoidea): visitas, interações e consequências para polinização do maracujá (Passifloraceae). *Revta. Bras. Ent.* 33: 109-118.
- SCHLINDWEIN, C. & WITTMANN, D. 1995. Specialized solitary bees as effective pollinators of south Brazilian species of *Notocactus* and *Gymnocalycium* (Cactaceae). *Bradleya* 13: 25-34.
- SCHLINDWEIN, C. & WITTMANN, D. 1997. Stamen movements in flowers of *Opuntia* (Cactaceae) favour oligolectic pollinators. *Pl. Syst. Evol.* 204: 179-193.
- SCOBELL, S. A. & Scott, P. E. 2002 Visitors and floral traits of a hummingbird-adapted cactus (*Echinocereus coccineus*) show only minor variation along an elevational gradient. *American-Midland-Naturalist* 147 (1): 1-15.
- SCOGIN, R. 1985. Nectar constituents of the Cactaceae. *The Southwestern Naturalist* 30: 77-82.
- SOKAL, R. R., ROHLF, J. R. F. 1981. *Biometry*, 2nd ed. San Francisco: W. H. Freeman.
- SILVA, W. R. & SAZIMA, M. 1995. Hawkmoth pollination in *Cereus peruvianus*, a columnar cactus from southeastern Brazil. *Flora* 190:339-343.
- STILES, F. G. 1981. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Ann. Miss. Bot. Gard.* 68: 323-351.
- SUZAN, H., NABHAN, G. P & PATTEN, D. T 1994. Nurse plant and floral biology of a rare night-blooming cereus *Peniocereus striatus* (Brandeggee) F. Buxbaum. *Conservation Biology* 8(2): 461-470.

- TAYLOR, N. P. 2000. Taxonomy and phytogeography of the Cactaceae of Eastern Brazil, Supplement 1 (Formal Taxonomic Treatment of the Cactaceae of Eastern Brazil). Unpubl. PhD Thesis. Open University, Milton Keynes.
- TAYLOR, N. P. & ZAPPI, D. C. 1989. An alternative view of generic delimitation and relationships in tribe Cereeae (Cactaceae). *Bradleya* 7: 13-40.
- TSCHAPKA, M., von HELVERSEN, O. & BARTHLOTT, W. 1999. Bat pollination of *Weberocereus tunilla*, an epiphytic rain forest cactus with functional flagelliflory. *Plant-Biology* 1: 554-559.
- VIANA, M. L., ORTEGA, B. P., SARAVIA, M., BADANO, E. I. & SCHLUMBERGER, B. 2001. Biología floral y polinizadores de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) en el Parque Nacional Los Cardones, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 49: 279-285.
- VOGEL, S. 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, Argentina* 59: 4-30.
- WALLACE, R. S. & COTA, J. H. 1996. An intron loss in the chloroplast gene *rpoC1* supports a monophyletic for the subfamily Cactoideae. *Current Genetics* 29: 275-281.
- ZAPPI, D. C. 1994. *Pilosocereus* (Cactaceae): The genus in Brazil. *Succulent Plant Research*, vol. 3. Royal Botanic Gardens, Kew.



Figure 1. Flowers and floral visitors of *Micranthocereus flaviflorus* and *M. streckeri* in NE Brazil. (A-B) Female of *Chlorostilbon aureoventris* and *Phoebis philea* on flowers of *M. flaviflorus*, respectively. (C-D) Males of *Chlorostilbon aureoventris* on flower of *M. streckeri*; note the presence of pollen grains on the bill of the hummingbird (D, arrow). (E-F) *Phaethornis squalidus* and a Hesperidae species on flowers of *M. streckeri*, respectively.

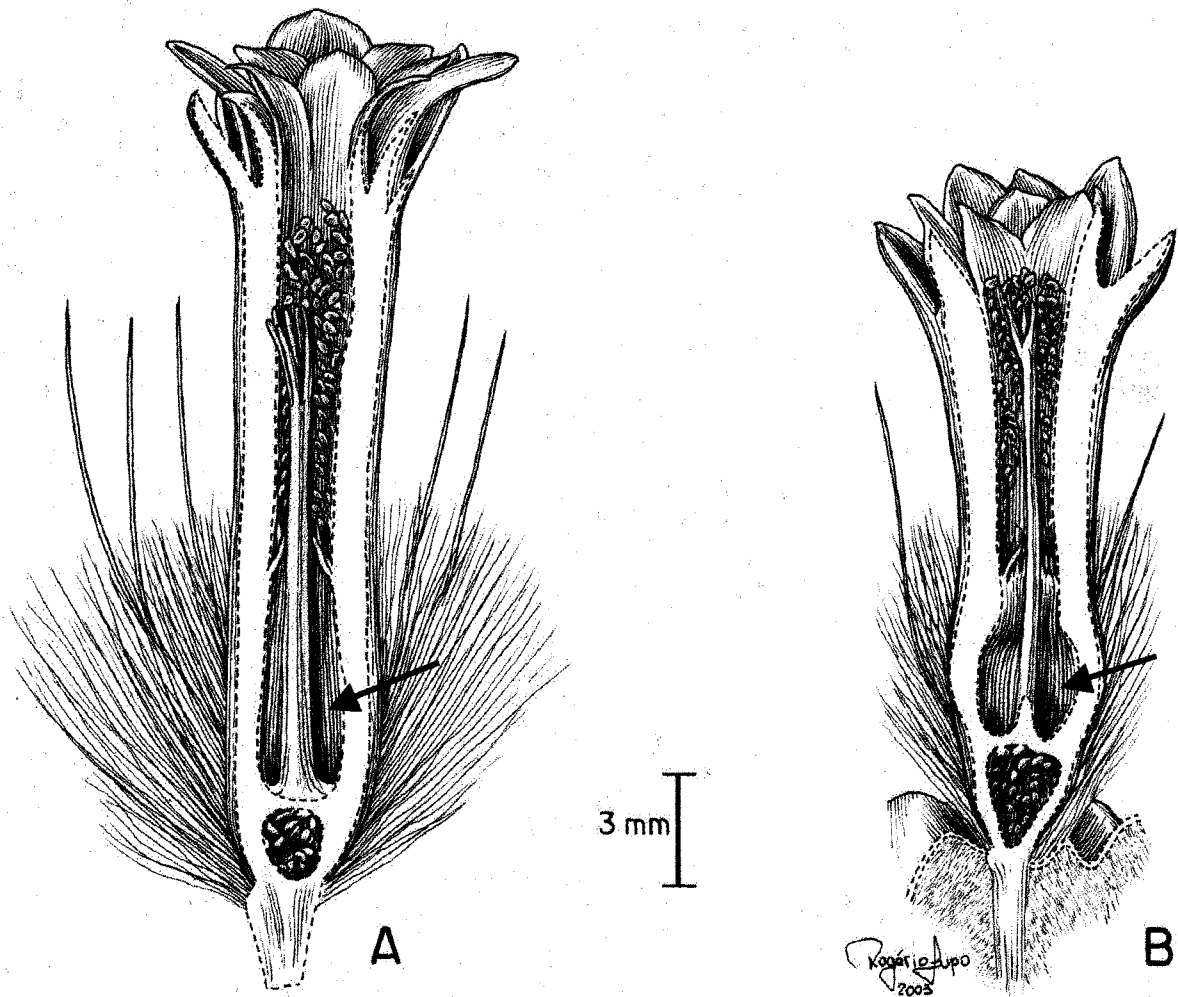


Figure 2. Longitudinal section of flowers of *Micranthocereus flaviflorus* (A) and *Micranthocereus streckeri* (B). Note de nectar chamber (arrow).

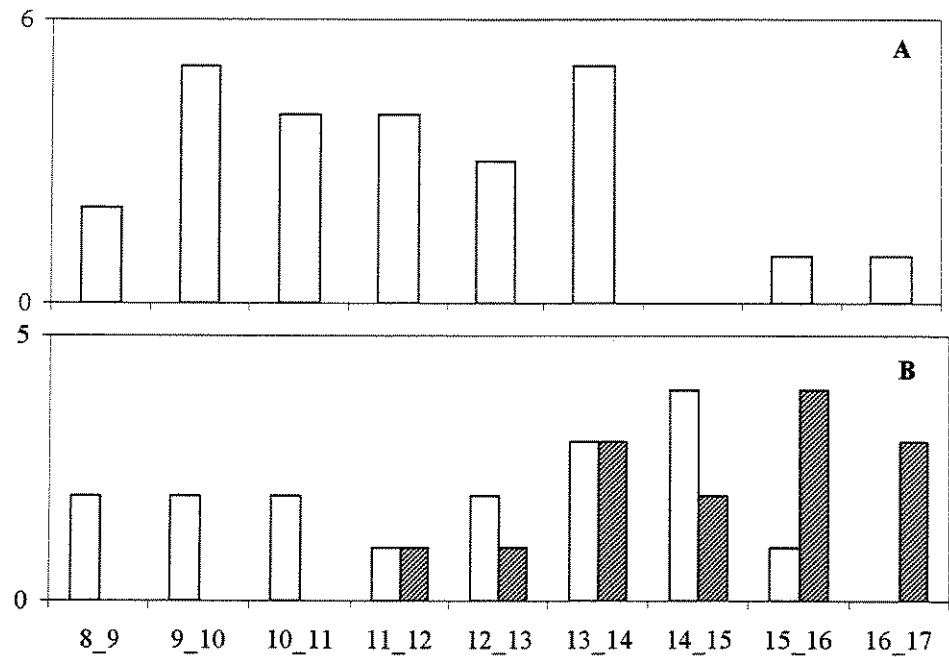


Figure 3. Frequency of visiting bouts of *Micranthocereus flaviflorus* and *Micranthocereus streckeri* pollinators in NE Brazil. A. Males of *Clorostilbon aureoventris* on flowers of *M. flaviflorus*. B. *Phaethornis squalidus* (hatched bars) and male of *C. aureoventris* (white bars) on *M. streckeri* flowers.

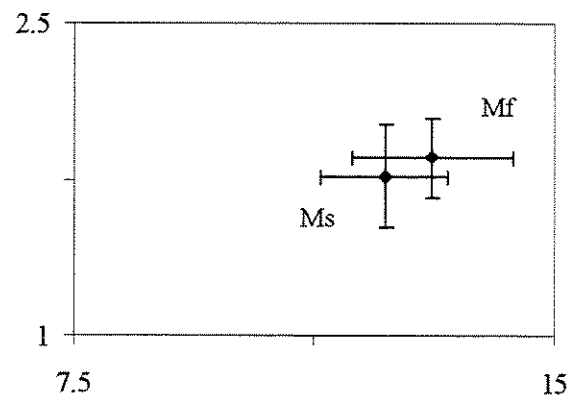


Figure 4. Flower length and diameter (mm) of *Micranthocereus flaviflorus* (Mf) e *Micranthocereus streckeri* (Ms) in NE Brazil. Bars: standard deviations.

Nectar feature	<i>M. flaviflorus</i> (12)	<i>M. streckeri</i> (10)	t	P
Volume	5.17 ± 2.2	7.3 ± 3.8	-1.561	0.14
Concentration	23.3 ± 1.3	19.3 ± 1.8	5.870	0.00

Tabel 1. Comparison of nectar volume (µl) and concentration (% of sugars) of *Micranthocereus flaviflorus* and *Micranthocereus streckeri* flowers in NE Brazil. (n): number of flowers.

CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo demonstrou que o gênero *Micranthocereus* não é um grupo monofilético. Isto pode ser observado pela exclusão de *Micranthocereus dolichospermaticus* e *Micranthocereus estevesii* na análise morfológica e pela presença de *Coleocephalocereus goebelianus* inserido dentro do gênero tanto na análise morfológica como molecular (região *trnL-F* do DNA de cloroplasto).

Foi observado que caracteres tradicionalmente usados para definir *Micranthocereus*, tais como frutos indeiscentes, frutos não expelidos ativamente do cefálio ou frutos não circuncisos na base estão presentes em algumas espécies do gênero e também em outros gêneros proximalmente relacionados, como *Coleocephalocereus*, *Melocactus* e *Pilosocereus*.

Com base nas análises cladísticas utilizando caracteres morfológicos e macromoleculares, nenhuma mudança taxonômica pode ser sugerida. Ambas as análises apresentaram topologias distintas nas relações de parentesco entre os taxa estudados. As relações entre as espécies de *Micranthocereus* e de gêneros considerados próximos ainda permanecem incertas, o que pode ser observado nos cladogramas formados com de 'bootstrap' relativamente baixos. O segmento de DNA investigado (região *trnL-F*) não foi suficientemente informativo para elucidar as relações entre as espécies. Ainda se faz necessário a utilização de outro marcador molecular para que as relações de parentesco entre as espécies de *Micranthocereus* e gêneros próximos sejam melhores compreendidas.

Em relação à biologia floral de *Micranthocereus flaviflorus* e *Micranthocereus streckeri*, foi observado que ambas as espécies apresentam mecanismos de polinização semelhantes. Beija-flores da espécie *Clorostilbon aureoventris* são os polinizadores efetivos de ambas as espécies. *C. aureoventris* apresenta durante o

mesmo dia tanto comportamento 'trapliner' quanto territorialista. Esses comportamentos em *C. aureoventris* já foram observados em estudos realizados com outras espécies de Cactaceae.