



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



BÁRBARA LAÍS RAMOS BARBOSA



DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *CROTON MUSCICAPA* MÜLL. ARG. E
***CROTON LONGIBRACTEATUS* MART. GORD. & DE LUNA**
(EUPHORBIACEAE)

Feira de Santana – BA

2017

BÁRBARA LAÍS RAMOS BARBOSA

**DIFERENCIAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA EM
POPULAÇÕES DE *CROTON MUSCICAPA* MÜLL. ARG. E
CROTON LONGIBRACTEATUS MART. GORD. & DE LUNA
(EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Santos Carneiro Torres

Co-orientadora: Prof. Dra. Reyjane Patrícia de Oliveira

Feira de Santana - BA

2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteadó – UEFS

Barbosa, Bárbara Laís Ramos
B195 Diferenciação morfológica e genética em populações de *Croton muscicapa* Müll. Arg. e *Croton longibracteatus* Mart. Gord. & de Luna (*Euphorbiaceae*) / Bárbara Laís Ramos Barbosa. – Feira de Santana, 2017.
112 f.: il.

Orientadora: Daniela Santos Carneiro Torres.
Co-orientadora: Reyjane Patrícia de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2017.

1. *Croton*. 2. Morfologia. 3. Genética. 4. *Euphorbiaceae*. I. Torres, Daniela Santos Carneiro, orient. II. Oliveira, Reyjane Patrícia de, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU 582.757

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Márcio Lacerda Lopes Martins
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB)



Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach
(Universidade Federal da Bahia - UFBA)



Profa. Dra. Daniela Santos Carneiro Torres
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

Aos meus queridos e amados pais, Ivan e Carmen, que me ensinaram o melhor caminho para a obtenção do amor, da felicidade e da sabedoria; foram vocês que me proporcionaram os melhores momentos vividos e com certeza proporcionarão os que estão por vir. Aos amantes do estudo, que buscam sempre o caminho das novas experiências chegando assim, as descobertas importantes e renovações do saber.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu Único e Eterno Deus, autor da minha vida, que tem me sustentado e vem me concedendo toda a força necessária para enfrentar os desafios existentes; por ter me oferecido a oportunidade de viver, evoluir a cada dia e chegar até aqui.

A minha Família por me conceder uma educação de qualidade, por me fornecer todo o carinho e amor necessário para a construção da vida. Mainha, painho, irmão, cunhada e bebê lindo da titia amo vocês eternamente!

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, oferecido pela Universidade Estadual de Feira de Santana, sob a coordenação da professora Claudinéia Pelacani e do professor José Raniere. Obrigada professores, por cada conselho e palavra de ânimo que me deram. Lutei e consegui chegar!

A minha orientadora Dany e a minha coorientadora Paty, pela oportunidade de crescer cientificamente. Obrigada pela confiança e pela oportunidade de recomeçar! Obrigada por cada ensinamento dado, admiro vocês demais! Ficarão em meu coração eternamente! Que Deus abençoe vocês sempre, e minha eterna gratidão.

Aos meus colegas de laboratório (Lamol) e Herbário, obrigada pela companhia, pelo espaço para a realização do trabalho. Saibam que vocês estarão guardados para sempre em meu coração.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Iasmin e João, vocês são 10! Perdoem-me pelo incômodo que causei tantas vezes. Obrigada por cada ensinamento, pela paciência ao tirar minhas dúvidas, por cada palavra amiga e cada risada maravilhosa que demos.

Aos lindos Ariane, José Neto e Maurício pela amizade e por todo o auxílio que me deram durante as coletas do material para a elaboração do trabalho. Nossas coletas foram pirambeiras, mas foi tudo maravilhoso e nos divertimos muito. Obrigada por cada conselho, cada conversa! Minha gratidão eterna a vocês.

A Marcos Dórea (Marquinhos), pelo grande auxílio com as análises do MEV! Muito obrigada mesmo!

Ao professor Fabiano Martins (UFRB), pelo auxílio maravilhoso ao trabalho de anatomia. Obrigada por tudo!

A Angélica Mascarenhas, a minha Angel, por todo o tempo dedicado a me auxiliar com os dados de anatomia e pelas nossas conversas construtivas! Você é show! Muito obrigada, gata!

A minha amiga e irmã, Eliza Maiara, por está sempre ao meu lado compartilhando os momentos bons e ruins. Obrigada por suportar minhas birrinhas e estresses. Obrigada pelos conselhos, pela companhia e saiba que adorei morar contigo! Da graduação à eternidade, moral!

A Naná, minha amiga do coração, pelas tantas risadas, pelos sorvetes, conversas, conselhos, pelas tentativas de vida fitness! Tenho certeza que encontrei uma amizade para a vida toda.

As minhas guerreiras Raiany Castro e Clisneide Coelho por lutarem junto comigo! Apesar de todo o sofrimento que passamos, aprendi junto com vocês a ser mais forte e persistente. Amo vocês, minhas gatas!

A minha Gilmara (Gil), pela amizade que surgiu durante o mestrado e com certeza já foi eternizada! Você é especial para mim. Agradeço por todas as palavras de apoio e incentivo! Seus conselhos foram essenciais! Jamais irei esquecer o seu ombro amigo no momento em que eu mais precisei.

A Kaio (Binho) pelas historinhas, risadinhas e partilha de conhecimento! Você é um amor, mulher!

A Luma, pelas conversas e distrações. Nossa amizade surgiu durante o mestrado e quero que seja eterna!

As Xixa's (Daiane, Flávia, Paty, Eliza e Gil), vocês são as amigas maravilhosas que Deus me presenteou! Vamos cantar, dançar e comer para comemorar as nossas vitórias! Obrigada pela amizade sincera!

A todos os meus amigos, os “velhos” e os novos, vocês sabem que sou chatinha, mas guardo cada um em meu coração! Obrigada pela força, companheirismo em todos os momentos, pelas brincadeiras e pelas orações realizadas por nós. Que Deus guie-nos sempre! Amém.

“Acredite, é hora de vencer
Essa força vem de dentro de você
Você pode até tocar o céu, se crer
Acredite, que nenhum de nós
Já nasceu com jeito pra super-herói
Nossos sonhos a gente é quem constrói
É vencendo os limites, escalando as fortalezas
Conquistando o impossível pela fé...”

Conquistando o Impossível – Jamile

RESUMO

O presente trabalho consiste no estudo de delimitação específica de *Croton muscicapa* Müll. Arg. e *Croton longibracteatus* Mart. Gord. & de Luna, pertencentes ao gênero *Croton* L., um dos maiores de Euphorbiaceae. Foi analisada a diferenciação e as relações entre essas duas espécies e morfotipos associados ocorrentes ao longo da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes no Brasil. Para isso, foram previamente analisadas amostras das duas espécies em herbário e coletadas 11 populações que correspondem a cinco grupos morfológicos, sendo aplicados diferentes métodos de análise. Os morfotipos foram inicialmente testados através de morfometria tradicional uni e multivariada, envolvendo 37 variáveis vegetativas e florais. Também foram realizadas análises de estruturação e variabilidade genética a partir de marcadores moleculares ISSR, e sendo selecionados os oito primers mais variáveis e obtidas 116 loci polimórficos. Dados de anatomia e micromorfologia foliar também foram obtidos para representantes das 11 populações, através de microscopia óptica e microscopia eletônica de varredura, respectivamente. A partir das amostras analisadas, observou-se que os caracteres vegetativos são muito mais variáveis que os reprodutivos e menos informativos para fins taxonômicos nesse grupo. Do ponto de vista genético, as populações demonstraram alta estruturação e baixa variabilidade. Através dessas diferentes linhas de evidência, foram confirmados quatro grupos bastante distintos, dois deles correspondendo a *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, restritas à Chapada Diamantina e áreas adjacentes, no estado da Bahia, Brasil. Duas novas espécies são propostas (*C. aemulus* Barbosa & Carn.-Torres e *C. graomogolensis* Barbosa & Carn.-Torres), endêmicas da região norte de Minas Gerais. Estas espécies podem ser separadas especialmente por indumento no limbo, quantidade e comprimento de glândulas na margem do limbo, comprimento das flores pistiladas e estaminadas e quantidade de estames. *Croton aemulus* corresponde a um híbrido natural, confirmado pelo *pool* gênico compartilhado entre *C. longibracteatus* e *C. graomogolensis*. É apresentada uma recircunscrição para *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, além de descrições, chaves para identificação, ilustrações, fotografias, mapas de distribuição e comentários gerais para todas as espécies. Com base nos caracteres anatômicos e micromorfológicos, essas quatro espécies apresentam alguns caracteres compartilhados, mas diferem pela posição dos estômatos, superfície do pecíolo, comprimento das glândulas da margem do limbo e a quantidade de compostos secundários. As duas novas espécies são consideradas ameaçadas de extinção, de acordo com os critérios da IUCN.

Palavras-Chave: *Croton*, delimitação, morfologia, genética

ABSTRACT

The present work consists in the specific delimitation study of *Croton muscicapa* Müll. Arg. and *Croton longibracteatus* Mart. Gord. & de Luna, belonging to *Croton* L., one of the biggest genus of Euphorbiaceae. It was analyzed the differentiation and the relations between these two species and associated morphotypes occurring along Espinhaço Range and adjacent areas in Brazil. For this purpose, samples of two species from herbarium were previously analyzed and 11 populations were collected, which correspond to five morphological groups, being used different methods of analysis. Morphotypes were tested by traditional uni and multivariate morphometrics involving 37 vegetative and floral variables. In addition, analyses of structuring and genetic variability using ISSR markers were realized, selecting the eight most variable primers and obtained 116 polymorphic loci. Foliar anatomy and micromorphology data was obtained from representatives of the 11 populations by optical and scanning electronic microscopy, respectively. Based on analyzed samples, it was observed that vegetative characters are much more variable than reproductive ones and are less taxonomically informative in this group. From the genetic point of view, the populations demonstrated high structuring and low variability. These different lines of evidence confirmed four distinct groups, two corresponding to *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*, restricted to Chapada Diamantina and adjacent areas in Bahia, Brazil. Two new species are proposed (*C. aemulus* Barbosa & Carn.-Torres and *C. graomogolensis* Barbosa & Carn.-Torres), endemic to North of Minas Gerais. These species can be separated principally by limb indumentum, quantity and length of glands in the limb margin, length of pistillate and staminate flowers and amount of stamens. *Croton aemulus* corresponds to a natural hybrid, confirmed by the genetic pool shared between *C. longibracteatus* and *C. graomogolensis*. It is presented a recircumscription for *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*, besides descriptions, key for identification, illustrations, photos, distribution maps and general comments for all species. The four species share anatomical and micromorphological characters, however, differs by the position of stamens, petiole surface, length of glands in the limb margin and quantity of secondary compounds. The two new species are considered as endangered, according to IUCN criteria.

Key words: *Croton*, delimitation, morphology, genetic

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica das espécies *Croton muscicapa* (Müll. Arg.) e *Croton longibracteatus* (Mart. Gord. & De Luna) abrangendo os estados da Bahia e Minas Gerais. 25

Figura 2. *Croton muscicapa* Müll.Arg. **A-B.** Hábito. **C.** Flores estaminadas. **D.** Botões das flores estaminadas e flores pistiladas. *Croton longibracteatus* Mart.-Gord. & de Luna. **E-F** Hábito. **G.** Inflorescência com flores pistiladas e bractéolas. **H.** Inflorescência com estames exsertos. Foto: D.S. Carneiro-Torres, B.L. R. Barbosa. 26

CAPÍTULO 1

Figura 1. Distribuição geográfica de *C. longibracteatus* (○) e *C. muscicapa* (Δ). Pontos dentro dos símbolos são áreas coletadas. *C. muscicapa* (CM1, CM2, CM3) em vermelho; morfotipo CAM1 rosa; morfotipo CAM2 vermelho escuro; *C. longibracteatus* (CL1, CL2, CL3, CL4, CL5) verde claro; e morfotipo CAL verde escuro. 70

Figura 2. Populações de espécies de *Croton* analisadas. **A–C:** *C. muscicapa*. **A.** Inflorescência com botões estaminados e flor pistilada; **B.** Flores pistiladas; **C.** Inflorescência com botões e flores estaminadas. **D–F** População CAM1. **D.** Hábito; **E.** Inflorescência com flor pistilada; **F.** Inflorescência com botões e flores estaminadas; **G–H** População CAM2. **G.** Inflorescência com flores estaminadas; **H.** Inflorescência com flores pistiladas; **I–K** *C. longibracteatus*. **I.** Hábito; **J.** Inflorescência com botões estaminados e flor pistilada; **K.** Inflorescência com flores pitiladas, e flores e botões estaminados; **L–O:** População CAL **L.** Hábito; **M.** Inflorescência com flores pistiladas e flor estaminada; **N.** Flor pistilada; **O.** Inflorescência com flores estaminadas. Fotos: D.S. Carneiro-Torres e B.L.R. Barbosa. 71

Figura 3. Caracteres utilizados na avaliação morfométrica entre as espécies de *Croton* analisadas. **1-10:** *Folha* **1.** Comprimento; **2.** Largura $\frac{1}{4}$; **3.** Largura $\frac{1}{2}$; **4.** Largura $\frac{3}{4}$; **5.** Ângulo do ápice; **6.** Ângulo da base; **7.** Comprimento do pecíolo; **8.** Largura do pecíolo; **9.** Comprimento da estípula; **10.** Largura da estípula. **11-12** *Inflorescência* **11.** Comprimento do pedúnculo; **12.** Comprimento da inflorescência. **13-23** *Flor estaminada* **13.** Comprimento da flor; **14.** Comprimento do pedicelo; **15.** Comprimento do maior estame; **16.** Comprimento da sépala; **17.** Largura da sépala; **18.** Comprimento da pétala; **19.** Largura da pétala; **20.** Comprimento da bractéola; **21.** Largura $\frac{1}{4}$ da bractéola; **22.** Largura $\frac{1}{2}$ da bractéola; **23.** Largura $\frac{3}{4}$ da bractéola. **24–32** *Flor pistilada* **24.** Comprimento da flor; **25.** Comprimento do pedicelo; **26.** Comprimento da sépala; **27.** Largura de sépala; **28.** Comprimento da bractéola; **29.** Largura $\frac{1}{4}$ da bractéola; **30.** Largura $\frac{1}{2}$ da bractéola. **31.** Largura $\frac{3}{4}$ da bractéola; **32.** Comprimento do maior estilete. 72

Figura 4. Representação dos escores dos três primeiros eixos da CVA usando 10 caracteres vegetativos em 11 populações de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*. 73

A. Eixo canônico 1 e 2; **B.** Eixo canônico 1 e 3. Os nomes das populações encontram-se da Tabela 1.

Figura 5. Representação dos escores dos três primeiros eixos da CVA usando 37 caracteres morfológicos em 11 populações estudadas. **A.** Eixo canônico 1 e 2; **B.** Eixo canônico 1 e 3. Os nomes das populações encontram-se da Tabela 1. 74

Figura 6. Dendrograma apresentando as relações fenéticas entre as populações analisadas, construído usando a matriz de Distância Generalizada de Mahalanobis com algoritmo de agrupamento UPGMA. Baseado em: **A.** 10 caracteres vegetativos para as 11 populações. **B.** 37 caracteres morfológicos vegetativos e reprodutivos para 11 populações; Os nomes das populações encontram-se na Tabela 1. 75

Figura 7. Análise de agrupamento das populações a partir dos dados genéticos, através da distância genética de Nei obtida a partir de ISSR, utilizando o método de Neighbor-Joining. Para os códigos das populações, ver Tabela 1. 76

Figura 8. Mapa indicando a área de coleta, nos estados da Bahia e Minas Gerais, e estruturação genética das 11 populações analisadas no trabalho. As cores nas localizações de coletas do mapa estão relacionadas ao gráfico de estruturação gerado a partir de dados moleculares de ISSR com o Software STRUCTURE indicando o valor de $\Delta K=4$. 77

CAPÍTULO 2

Figura 1. *C. aemulus* and *C. graomogolensis*. **A-E** *C. aemulus* (Barbosa et al. 19, HUEFS). **A.** Habit; **B.** Stipules glandular lanceolate; **C.** Bracts; **D.** Staminate flower; **E.** Pistillate flower. **F-L** *C. graomogolensis* (Barbosa et al. 17, HUEFS). **F.** Habit; **G.** Stipules glandular like a brunch of grapes; **H.** Bracts in frontal view; **I.** Bracts in lateral view; **J.** Staminate flower; **K.** Pistillate flower; **L.** Ovary and styles. Drawing by Natanael Nascimento. 104

Figura 2. *C. aemulus* and *C. graomogolensis*. **A-F** *C. aemulus*. **A.** Habit; **B.** Inflorescences with staminate flowers and bracts. **C.** Inflorescences with flower-bud, staminate and pistillate flowers. **D.** Leaf and stipules, branch pubescent. **E-F.** Pistillate flowers. **G-L.** *C. graomogolensis*. **G.** Habit. **H.** Inflorescences with flower-bud and staminate flower. **I.** Inflorescences with flower-bud, staminate flowers and fruit. **J.** Pistillate flowers and stipules. **K.** Pistillate flowers. **L.** Branch. Photos by D.S. Carneiro-Torres and B.L.R Barbosa. 105

Figura 3. Morphological comparisons between species. Leaf margin, stipules, sepals and bracts. **A.** *C. longibracteatus* (B.L.R. Barbosa et al. 11); **B.** *C. aemulus* (B.L.R. Barbosa et al. 19); **C.** *C. muscicapa* (B.L.R. Barbosa et al. 04); **D.** *C. graomogolensis* (B.L.R. Barbosa et al. 17). Scale bars = 1mm. 106

Figura 4. *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*. **A – E** *C. muscicapa* **A.** Habit; **B.** Leaf glabrous; **C.** Stipules glandular like a brunch of grapes; **D.** Staminate flower; **E.** Pistillate flower. **F– J** *C. longibracteatus* **F.** Habit; **G.** Leaf with details of the 107

adaxial surface subglabrous and abaxial surface pubescent; **H.** Stipules glandular lanceolate; **I.** Staminate flower; **J.** Pistillate flowers without one sepal. Drawing by Lucas Menezes.

Figura 5. Distribution map of *C. aemulus*, *C. graomogolensis*, *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*. Simbol (●) is for collected areas. 108

Figura 6. Micromorphological comparisons based on petiole (A-D), of *C. longibracteatus* (A), *C. aemulus* (B), *C. muscicapa* (C) e *C. graomogolensis* (D). Scale bars: 200µm. 109

Figura 7. Micromorphological comparisons based on vein (A-D) and glandular leaf margin (E-H) in *C. longibracteatus* (A, E), *C. aemulus* (B, F), *C. muscicapa* (C, G) e *C. graomogolensis* (D, H). Scale bars: 200µm. 110

Figura 8. Micromorphological comparisons based on SEM on adaxial surface (A, D, G, I) and abaxial surface (B, E, H, K) and glands on leaf margins (C, F, I, K) of the *C. longibracteatus* (A-C), *C. aemulus* (D-F), *C. muscicapa* (G-I) and *C. graomogolensis* (J-L). Scale bars: 100µm. 111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Identificação das populações analisadas com suas respectivas localidades, coordenadas geográficas, número de indivíduos, informações sobre vegetação e altitude utilizados na análise morfométrica e genética, e voucher que foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). 63

Tabela 2. Caracteres morfológicos utilizados na análise morfométrica de 11 populações estudadas. Valores de média \pm desvio padrão, seguido dos valores mínimos e máximos entre parêntesis. Letras diferentes sobrescritas na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$ a partir do teste de Tukey). Todas as medições contínuas são dadas em milímetros (mm). 64

Tabela 3. Relação dos oito primers de ISSR (Wolf 1998) selecionados para o estudo e suas respectivas seqüências iniciadoras. 66

Tabela 4. Classificação de indivíduos na análise de discriminante de 10 caracteres vegetativos nas 11 populações estudadas. Na Tabela 1 encontram-se os nomes das populações. 66

Tabela 5. Classificação de indivíduos na análise discriminante de 37 caracteres morfológicos (vegetativos e reprodutivos) em 11 populações analisadas. Na Tabela 1 encontram-se os nomes das populações. 66

Tabela 6. Correlações entre as variáveis e os três primeiros eixos canônicos discriminantes da CVA para as 11 populações. Os nomes das variáveis estão na Tabela 2. 67

Tabela 7. Parâmetros de variabilidade genética das 11 populações presentes nesse trabalho. **A** (Número de bandas), **%P** (Loci polimórficos), **He** (Heterozigosidade); **I** (Índice de Shannon). Identificação das populações na Tabela 1. 68

Tabela 8. Identidade Genética de Nei (Nei Unbiased Genetic Identity – Nei 1978) estimada com base nos padrões de ISSR entre as populações analisadas. Para os códigos das populações, ver Tabela 1. 69

Tabela 9. Resumo da análise Molecular de Variância (AMOVA) das populações analisadas, a partir de dados de ISSR. Para os códigos das populações, ver Tabela 1. 69

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Morphological comparisons between *Croton muscicapa*, *C. longibracteatus*, and the new species *C. aemulus* and *C. graomogolensis*. 100

Tabela 2. Micromorphological comparisons based on leaf anatomy and SEM analysis. 100

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
CAPÍTULO 1- Diferenciação morfológica e genética entre <i>Croton muscicapa</i> e <i>C. longibracteatus</i> (Euphorbiaceae) da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes, Brasil: implicações taxonômicas e evidências de hibridação	27
1.1 Introdução	30
1.2 Material e Métodos	33
1.3 Resultados	38
1.4 Discussão	41
REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 2 - <i>Croton aemulus</i> and <i>C. graomogolensis</i> (Euphorbiaceae): two new species from Minas Gerais, Brazil, based on distinct lines of evidence and their relation with <i>C. muscicapa</i> and <i>C. longibracteatus</i>	78
2.1 Introdução	81
2.2 Material e Métodos	83
2.3 Resultados e Discussão	84
REFERÊNCIAS	96
CONCLUSÃO GERAL	112

INTRODUÇÃO GERAL

A família Euphorbiaceae ocorre predominantemente nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta, possuindo cerca de 6.300 espécies que são distribuídas em 246 gêneros (BERRY et al., 2005; HEYWOOD et al., 2007; WURDACK & DAVIS, 2009). No Brasil a família é representada por 948 espécies, que estão agrupadas em 64 gêneros, encontrada em diferentes tipos de vegetação do país, como Florestas, Cerrado, Caatinga, Restinga, Pampa, Pantanal e Campos Rupestres (CARNEIRO et al., 2002; SECCO et al., 2013; CORDEIRO et al. 2016). Euphorbiaceae é representada por árvores, arbustos, ervas ou lianas e é uma das mais diversificadas e complexas famílias de Angiospermas, pois apresenta grande variação morfológica dos gêneros e espécies, além de ampla distribuição geográfica. (CARNEIRO-TORRES, 2009; SECCO & BERRY, 2013).

No decorrer da histórica taxonômica da família, Webster (1975, 1994) propôs uma classificação para Euphorbiaceae, subdividindo-a em cinco subfamílias, as quais foram separadas pelo número de óvulos por lóculo, presença do látex, forma dos laticíferos e morfologia do pólen, em: Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae, sendo que as duas primeiras possuem dois óvulos por lóculo e as demais apenas um óvulo. Porém, estudos filogenéticos baseados em dados moleculares foram responsáveis por mudanças nessa circunscrição. No seu *sensu stricto*, a família Euphorbiaceae inclui apenas as linhagens com um óvulo por lóculo (Acalyphoideae, Crotonoideade, Cheilosoideae e Euphorbioideae), sendo aquelas com dois óvulos por lóculo segregadas nas famílias Phyllanthaceae, Picrodendraceae, Peraceae e Putranjivaceae (WURDACK et al., 2005 SECCO et al., 2012).

Souza & Lorenzi (2012), retrataram que a família possui grande importância econômica e ecológica. Dentre os gêneros existentes para Euphorbiaceae, muitos se destacam seja pelo número de espécies que apresentam ou pela utilidade que possuem. Em termos mundiais, o gênero mais representativo é *Euphorbia* L. com ca de 1.600 espécies, seguido por *Croton* L. com 1.300. Judd e colaboradores (2009) destacaram algumas espécies com importância econômica, como: a seringueira (*Hevea brasiliensis* Willd. ex A. Juss.) Müll.Arg.) na produção de borracha, a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na alimentação e algumas espécies de *Euphorbia* L., *Jatropha* L., *Codiaeum* Rumph. Ex A. Juss. e *Acalypha* L. que são cultivadas como ornamentais.

O gênero *Croton*, incluído na subfamília Crotonoideae, possui uma distribuição pantropical e é um dos maiores da família Euphorbiaceae, apresentando 1.300 espécies (BERRY et al., 2005), dentre as quais 311 ocorrem no Brasil, destas 249 são endêmicas (CORDEIRO et al. 2015). As espécies descritas para o Brasil incluem árvores, subarbustos a ervas, sendo que a maioria delas é encontrada em vegetações abertas ou florestas secas, mas podem ocorrer também em matas úmidas (CARNEIRO-TORRES, 2009)

Croton é considerado um "gênero gigante", por apresentar uma alta diversidade de espécies incluídas no The World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae, trabalho apresentado por Govaerts et. al. (2000). Apesar da riqueza de espécies, o gênero ainda é considerado pouco estudado no Brasil, sendo a revisão mais conhecida para o país a de Müller (1873), na "Flora Brasiliensis". Essa obra constitui o ponto de partida para realização dos estudos atuais, apesar de desatualizada devido às recentes sinonimizagens, descrições de novas espécies e mudanças na circunscrição do gênero (GUIMARÃES & SECCO, 2010; SECCO, 2009).

Segundo Lima & Pirani (2003) e Carneiro-Torres (2009), mesmo as espécies sendo consideradas muito polimórficas, o gênero pode ser reconhecido por possuir indumento com tricomas tectores e/ou glandulares, simples, estrelados, lepidotos ou dendríticos, folhas alternas, podendo conter glândulas nas margens e na base do limbo ou ápice do pecíolo, inflorescências espiciformes, com flores unissexuadas, geralmente em plantas monóicas, ou raramente dióicas, com uma ou várias flores por brácteas, sendo geralmente as flores pistiladas na porção proximal da raque e as estaminadas na parte distal, pétalas das flores pistiladas reduzidas ou ausentes, estames encurvados no botão floral e grãos de pólen esféricos, inaperturados, com ornamentação crotonóide da exina.

Carneiro-Torres (2009) considerou que a maior dificuldade em se estudar *Croton* está justamente na circunscrição da maioria de suas espécies, principalmente aquelas que apresentam uma ampla distribuição geográfica, que em geral são consideradas as mais polimórficas. Esse fator levou, muitas vezes, à publicação de vários binômios para a mesma espécie, gerando assim muitos problemas de nomenclatura e de tipificação, que são difíceis de solucionar. Esse fato também foi confirmado por Riina et. al. (2009), que afirmaram que a taxonomia de *Croton* tem demonstrado ser complexa, não só devido ao tamanho do gênero, mas também por possuir uma grande distribuição geográfica e diversidade morfológica.

Estudos de levantamentos florísticos já realizados no Nordeste Brasileiro indicam a alta diversidade do gênero na região, onde são registradas 118 espécies (CORDEIRO et al., 2015), algumas ocorrendo em simpatria, florescendo em uma mesma época, mas sem possuir

evidências claras de hibridização interespecífica (PÔRTO, 2007). Porém esses estudos ainda são insuficientes para que se possam avaliar os limites específicos no gênero (PÔRTO, 2007).

Van Ee et al. (2011) propuseram uma nova classificação para as espécies de *Croton* do Novo Mundo com 31 seções e dez subseções, muitas apresentando uma taxonomia confusa. Entre essas espécies encontram-se *Croton muscicapa* Müll.Arg. (1873) e *Croton longibracteatus* Mart. Gord. & De Luna (2005), próximas morfologicamente e filogeneticamente em *Croton* seção *Barhamia* (Klotzsch) Baill., subseção *Barhamia* (Klotzsch) B.W. van Ee (VAN EE et al., 2011), juntamente com mais 17 espécies. As espécies dessa seção possuem indumento estrelado a glabro, folhas com margem serrilhadas ou denteadas, sem glândulas na base do limbo com o ápice do pecíolo, as estípulas, brácteas e margem das sépalas das flores pistiladas glandulares com (3) 8-15 (20) estames (VAN EE et al. 2011).

Em 1873 Müller descreveu *C. muscicapa*, na Flora Brasiliensis com base no material da Bahia, coletado na Serra do Gado Bravo, próximo a Villa Nova da Rainha, *Martius 2260*, depositado no herbário M (acrônimos segundo THIERS, 2016). Segundo Lima & Pirani (2003) e Carneiro-Torres (2009), essa espécie ocorre na Bahia e em Minas Gerais (Fig. 1), ao longo da Cadeia do Espinhaço, em florestas sazonalmente decíduais, cerrados de altitude, campos limpos, florestas de grotão, florestas de encosta e campos rupestres sobre solo arenoso, entre 500 e 1.200 m de altitude, porém os espécimes da Bahia diferem bastante daqueles de Minas Gerais. Essa espécie floresce de setembro a fevereiro e de maio a julho, e frutifica de dezembro a fevereiro e de maio a julho.

Croton muscicapa (Fig. 2A-D) é uma espécie arbustiva a subarbustiva, com limbo oval, ápice de agudo a acuminado, base cordada, margem serrilhada com glândulas estipitadas, as faces adaxial e abaxial são pubescentes a glabrescentes, o pecíolo é pubescente sem glândulas na base e as estípulas são transformadas em glândulas, semelhança a um cacho de uva. Suas inflorescências são terminais e contínuas, com brácteas fimbriado-glandulosas, as flores estaminadas possuem cinco sépalas e pétalas com 11 a 12 estames e as flores pistiladas possuem cinco sépalas com forma lanceolada e margem glandulosa-estipitada, sem pétalas, com ovário globoso e pubescente, estiletos unidos na base e tetrafidos. O Fruto é verde-vináceo, pubescente com sementes globosas e lisas (MÜLLER, 1873; CARNEIRO-TORRES, 2009).

Martínez-Gordillo & de Luna (2005), descreveram *C. longibracteatus* com base no material tipo de *R. M. Harley et al. 22675*, depositado no Herbário de Nova York (EUA), coletado a 7-10 km de Seabra-Itaberaba oeste de Lençóis, e em outros materiais coletados na

Chapada Diamantina, Bahia, Brasil, identificados anteriormente como *C. muscicapa*. Para esses autores *C. longibracteatus* é restrita ao estado da Bahia, onde ocorre em campos gerais e campos rupestres sobre solo arenoso com afloramentos rochosos, entre 400 e 1.200 m altitude e florescendo de fevereiro a dezembro (CARNEIRO-TORRES, 2009).

Croton longibracteatus (Fig. 2E-H) é um arbusto, viscoso, monóico, com limbo oval-triangular e ápice de acuminado a cuspidado, base cordada, margem denticulada com glândula, face adaxial esparso-pubescente a glabrescente e abaxial pubescente, esparso-pubescente a glabrescente, pecíolo esparso-pubescente a glabrescente e sem glândula, estípulas inteiras, em formato lanceolado, com margem digitada glandular. A inflorescência é terminal, contínua com flores estaminadas no ápice e pistiladas na base e brácteas lanceoladas com margem fimbriado-glandular. A flor estaminada possui cinco sépalas e pétalas e 11 estames e a flor pistilada com cinco sépalas, lanceoladas com margem glanduloso-estipitada, e sem pétalas, com ovário globoso e pubescente. O Fruto é verde-vináceo e pubescente, as sementes são subglobosas (MARTÍNEZ-GORDÍLLO & DE LUNA, 2005; CARNEIRO-TORRES, 2009).

Para Martínez-Gordillo & de Luna (2005), *C. longibracteatus* difere de *C. muscicapa* (Fig. 2) por apresentar estípulas e brácteas maiores, sépalas da flor pistilada maiores e acrescentes, e estames exsertos. No entanto, esses caracteres se sobrepõem ao longo da distribuição geográfica das espécies, como por exemplo, os estames exsertos e as sépalas maiores nas flores pistiladas que também podem ser observados em *C. muscicapa* (CARNEIRO-TORRES, 2009). Na descrição de *C. longibracteatus*, Martínez-Gordillo & de Luna (2005) informam que as folhas são glabras, porém Carneiro-Torres (2009), analisando um maior número de espécimes, observou materiais com limbo esparso-pubescente a glabrescente. Dessa forma, existe a necessidade de estudos mais aprofundados nesse grupo, para maior certificação na delimitação dessas espécies.

Segundo Martínez Gordillo & de Luna (2005) *C. longibracteatus* e *C. muscicapa* são espécies restrita à Bahia, Brasil, porém, Lima & Pirani (2003), Carneiro-Torres (2009) e Cordeiro et al. (2015) ampliaram a ocorrência dessas para o estado de Minas Gerais, Brasil (Fig. 1).

Croton muscicapa e *C. longibracteatus* são semelhantes morfológicamente a outras espécies da seção *Barhamia*. Segundo Carneiro-Torres (2009) *C. muscicarpa* é muito semelhante a *C. glutinosus* Müll. Arg quanto ao hábito e a forma das folhas, mas difere desta por possuir folhas com base cordada. Para Martínez Gordillo & de Luna (2005), *C. longibracteatus* está relacionada a quatro espécies, uma do Paraguai, *C. perviscosus* Croizat.

que difere por possuir folhas elípticas ou obovadas, estípulas serradas e pedicelos das flores pistiladas menores; e três da Bahia, Brasil, *C. muscicapa* onde difere pelo formato das estípulas que nesta é arredondado, as bractéolas e as sépalas das flores pistiladas maiores e os estames exsertos; *C. glutinosus* por possuir folhas com o ápice agudo e as bractéolas com glândulas somente na base; e de *C. betulaster* Müll. Arg. por apresentar o ápice das folhas arredondado e 14 a 18 estames.

Outra espécie semelhante morfológicamente a *C. muscicapa* é *C. adenocalyx* Baill. É muito comum encontrar nos herbários e banco de dados, espécimes de *C. adenocalyx* identificadas como *C. muscicapa*, porém *C. adenocalyx* possui face adaxial pubescente, estípulas fimbriado glandular e sépalas da flor pistilada com glândulas na margem sendo longo estipitadas, enquanto *C. muscicapa* possui face abaxial pubescente a glabra, estípulas glandulares semelhante a um cacho de uva e sépalas da flor pistilada com glândulas na margem curto estipitadas. Além disso, *C. adenocalyx* ocorre nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul e Sergipe (CARNEIRO-TORRES, 2009).

O fato de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus* serem semelhantes morfológicamente a outras espécies faz com que ocorram muitas identificações equivocadas. A identificação taxonômica é a base para diferentes trabalhos como florística, fitossociologia, etnobotânica, anatomia, fitoquímica, dentre outros, e quando não é realizada corretamente pode alterar os resultados e as conclusões dos trabalhos. Um exemplo disso é a descoberta de três novos alcalóides sesquiterpênicos do tipo guaiano, muscicapina A, B e C isolados das raízes do que seria *C. muscicapa* (ARAÚJO-JÚNIOR, 2005). O voucher citado no trabalho, *Agra 5995* coletado em Caicó, no Rio Grande do Norte e depositado no herbário JPB (acrônimos segundo Thiers 2016), acredita-se ser *C. adenocalyx*, que ocorre nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe, enquanto *C. muscicapa*, espécie semelhante morfológicamente, ocorre na Bahia e Minas Gerais (LIMA & PIRANI, 2003; CARNEIRO-TORRES, 2009). Desse modo a substância isolada e denominada “muscicapina” está associada à outra espécie, e não a *C. muscicapa*.

Outro exemplo é o estudo fitoquímico e de constituintes voláteis de folhas de *C. muscicapa* e *C. glutinosus* (GOMES, 2010). Nesse trabalho os autores informam que foram isoladas quatro substâncias das folhas de *C. muscicapa*, relatadas pela primeira vez na espécie, porém a espécie utilizada no trabalho foi *C. longibracteatus*, e não *C. muscicapa* como eles afirmaram. Dessa forma, existe a grande necessidade de estudar e conhecer a delimitação dessas espécies para que sejam esclarecidos os seus limites morfológicos e facilite o reconhecimento das mesmas, evitando a identificação incorreta desses materiais.

Há muito tempo o homem procura entender e explicar a questão da variabilidade dos seres vivos, como os mesmos evoluíram e de que forma sua diversidade pode ser mensurada. Neste sentido, pesquisadores do mundo todo utilizam marcadores (morfológicos e/ou moleculares) para compreender a diversidade e estrutura das populações (ZUCCHI et. al., 2011). Segundo Judd e colaboradores (2009), diferentes tipos de estudos podem confirmar padrões de variação em plantas – especialmente morfológicos, ecológicos, fenológicos e genéticos. E ainda, assumem que o ponto de partida para estudar tais variações consiste em acessar mais detalhadamente a heterogeneidade das populações, o que também é defendido por outros autores que abordam a Biosistemática, a exemplo de Stace (1989).

Desde o princípio do desenvolvimento da História Natural, um dos principais focos da curiosidade científica está relacionado à questão das variações de forma e tamanho que são observadas nos organismos na natureza. Muitas perguntas são realizadas sobre o assunto (por exemplo, “Por que algumas folhas são mais alongadas do que outras?”, “Por que algumas populações apresentam tricomas e outras não?”...). Todos estes questionamentos estão intimamente relacionados às mais variadas questões, que vão desde o entendimento da ecologia e distribuição dos diferentes grupos taxonômicos até os processos evolutivos envolvidos no surgimento de espécies (MORAES, 2003).

Para entender essas questões, os estudiosos sempre tentaram encontrar maneiras de medir e quantificar estas diferenças na forma e no tamanho dos organismos e suas estruturas (MORAES, 2003). Segundo Adams et. al. (2004), comparar as características morfológicas de organismos tem sido um elemento central da biologia durante séculos. A classificação taxonômica de organismos, e compreensão da diversidade biológica, foram ambas realizadas com base nas descrições das formas morfológicas, sendo que na atualidade também se utilizam dados moleculares. Na década de 1960 e 1970, biometristas começaram a utilizar ferramentas de estatística multivariada para descrever padrões de variação da forma dentro e entre grupos. Essa técnica hoje é chamada de morfometria tradicional ou morfometria multivariada.

Rohlf (1990) denomina a Morfometria como a descrição quantitativa, a análise e interpretação da forma e variação em biologia, sendo uma área fundamental da pesquisa. Para o autor, são necessárias técnicas de descrição e comparação de formas de estruturas que se baseiam na morfologia dos organismos em qualquer estudo sistemático. Segundo Plotze (2009), essas técnicas representam um novo paradigma para o estudo da evolução das formas biológicas e suas correlações com outras variáveis. Diversas aplicações de morfometria podem ser encontradas na área de ecologia, antropologia, botânica, entre outras.

Estudos com variabilidade genética e morfológica têm sido muito úteis na delimitação de espécies de plantas (DUMINIL & DI MICHELE, 2009). Os caracteres morfológicos são os mais utilizados para definir se os indivíduos de uma determinada espécie são morfológicamente mais semelhantes entre si do que os indivíduos de outra espécie (JUDD et al., 2009). Porém, nas últimas décadas os dados moleculares vêm sendo utilizados para auxiliar à delimitação das espécies baseadas apenas nas avaliações de caráter morfológico (DUMINIL & DI MICHELE, 2009).

O conhecimento da variabilidade genética que existe nas populações naturais é de grande importância para analisar a diversidade e obter informações sobre a evolução das espécies. Sendo assim, é necessário entender como essa variação surge e como se distribui em um contexto geográfico. Para tanto, é necessário investir em ferramentas que acessem a diversidade ocorrente nas populações, com objetivo de auxiliar na delimitação coerente das espécies (BRAMMER, 2002; JUDD et al. 2009). Dessa maneira, os marcadores moleculares em conjunto com as avaliações morfológicas são importantes ferramentas, realizando assim um estudo da diversidade genética de populações de determinada espécie.

A estrutura populacional de uma espécie é resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos. Na caracterização da estrutura populacional do ponto de vista ecológico, procura-se determinar qual é a densidade populacional, a natureza das relações entre os indivíduos e os diversos fatores ambientais, e as interações existentes entre os indivíduos e as populações locais. A abordagem genética e evolutiva, por outro lado, procura quantificar a variabilidade morfológica e quantitativa existente entre os indivíduos, seu comportamento reprodutivo, os padrões de fluxo gênico, e as estratégias adaptativas aos ambientes locais (MARTINS, 1987).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998) as diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para a verificação e detecção da variabilidade genética ao nível de sequência de Ácido Desoxirribonucléico (DNA). Guimarães et.al. (2009) afirmaram que com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, culminando com o surgimento dos marcadores moleculares na década de 1980. Desde esse acontecimento, esses marcadores têm acompanhado os avanços da era genômica, beneficiando-se da grande quantidade de informações de sequências de DNA disponíveis, além de possuírem vantagens sobre os marcadores morfológicos, pois essa tecnologia fornece um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma.

O grande desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998). Com o advento da tecnologia de Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em meados de 1980, novas perspectivas evoluíram para o campo da biologia molecular possuindo grande impacto em vários programas em que a técnica é aplicada (HOSHINO et. al., 2012). A técnica da PCR é uma reação que se baseia em ciclos repetidos de replicação *in vitro* da molécula de DNA, onde cada nova molécula sintetizada em um ciclo é utilizada como molde para o ciclo seguinte, onde resultará num aumento exponencial do número de moléculas (CAIXETA et. al., 2009).

Dentre os marcadores que utilizam a técnica de PCR, está o Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), que utiliza um único primer construído a partir de sequências de microssatélites. As principais vantagens apresentadas por esses marcadores é a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver a necessidade de se ter um conhecimento prévio de sequência de DNA para a construção do primer que será utilizado (FALEIRO, 2007). Os ISSR são marcadores dominantes, ou seja, não consegue diferir os locos em heterozigose dos locos em homozigose.

Wolfe et. al. (1998) desenvolveram um trabalho de grande importância para a área da genética. Antes dessa pesquisa os marcadores ISSR eram restritos a estudos com espécies cultivadas, porém com a realização desse trabalho, ficou comprovado que também existe um grande potencial desse marcador para estudos com populações naturais possuindo uma gama de aplicações através de um método que é tecnicamente viável e de baixo custo e é extremamente útil para aplicações que vão desde a genética da população, estudos sistemáticos a estudos ecológicos.

Assim, tendo conhecimento da necessidade de aprofundamento nos estudos das espécies, é de fundamental importância o investimento em trabalhos que possam observar diferentes populações de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, a fim de avaliar seus limites morfológicos e genéticos,. Com isso, pretendeu-se observar a diferenciação entre e dentro das populações dessas espécies ao longo da sua distribuição, com base nos referidos marcadores, a fim de contribuir para a delimitação das mesmas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. C.; ROHLF, F. J.; SLICE, D. E. Geometric morphometrics: ten year of progress following the 'revolution'. **Ital. J. Zool.**, 71, p. 5-16, 2004.
- ARAÚJO-JÚNIOR, V. T de et al. Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 3B, p. 553-557, 2005.
- BERRY, P. E. et al. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using *ITS* and *trnL-trnF* DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1520-1534. 2005.
- BRAMMER, S. P. Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. **EMBRAPA Trigo: Documentos Online**, n.29. 2002.
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B. de; BRITO, G. G de; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. UFV. Viçosa, MG. 2009.
- CARNEIRO-TORRES, D. S. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Bioma Caatinga**. 2009. 296f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2009.
- CARNEIRO, D. S.; CORDEIRO, I.; FRANÇA, F. A família Euphorbiaceae na flora de *Inselbergs* da Região de Milagres, Bahia, Brasil. **Bol. Bot. Uni. São Paulo**, 20, p. 31-47, 2002.
- CORDEIRO, I. et al. **Euphorbiaceae in FLORA DO BRASIL 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: 08 Nov. 2016.
- CORDEIRO, I. et al. ***Croton* in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 08 Nov. 2015.
- DUMINIL, J.; DI MICHELE M. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. **Plant Biosystems**, p. 1–15. 2009.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2007. 102 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA – CENARGEN, Brasília. 3ed. 1998. p.220.
- GOMES, L. C. **Estudo químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae)**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2010.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae and Pandaceae**. The Royal Botanic Gardens, Kew, v. 2. 2000. p. 417-536.

- GUIMARÃES, C. T. et al. Marcadores Moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, p. 24-33, 2009.
- GUIMARÃES, L. A. C.; SECCO, R. de S. As espécies de *Croton* L. sect. *Cyclostigma* Griseb. e *Croton* L. sect. *Luntia* (Raf.) G. L. Webster subsect. *Matourenses* G. L. Webster (Euphorbiaceae s.s.) ocorrentes na Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 40, n.3, p. 471 – 488. 2010.
- HEYWOOD, V. M. et al. Flowering Plant Families of the World. Firefly Books, 2007. 424p.
- HOSHINO, A. A. et al. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: CALISKAN, M (Ed.). **Genetic Diversity in Microorganisms**. Hard cover. 2012. 382p.
- JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 2009. 632 p.
- LIMA, L. R. de; PIRANI, J. R. O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, n.2, p. 299-344. 2003.
- MARTÍNEZ-GORDILLO, M.; DE LUNA, E. Espécie nueva de *Croton* (Euphorbiaceae) de Brasil. **Novon**, v.15, n.4, p. 568-571. 2005.
- MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **IPEF**, n.35, p.71-78, 1987.
- MORAES, D. A. de. A morfometria geométrica e a “revolução na morfometria” localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos. **BIOLETIM**, Ano III, n. 3, p. 1-5, 2003.
- MÜLLER, A. J. *Croton muscicapa*. **Flora Brasiliensis**. v.11, Part II, Fasc. 61, p. 199-200. 1873.
- PLOTZE, R. de O. **Visão Artificial e morfometria da análise e classificação de espécies biológicas**. 188f. Tese (Doutorado em Ciências da Computação e Matemática Computacional) – Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação (USP), São Carlos – SP, 2009.
- PÔRTO, N. A. **Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: crotonoideae) ocorrentes no Nordeste do Brasil**. 2007. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia - PB, 2007.
- RIINA, R.; BERRY, P. E.; VAN EE, B. W. Molecular Phylogenetics of the Dragon’s Blood *Croton* Section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): A Polyphyletic Assemblage Unraveled. **Systematic Botany**, v. 34, n. 2, p. 360–374. 2009.
- ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 21, p. 299-316, 1990.
- SECCO, R. S. Uma nova espécie de *Croton* sect. *Geiseleria* (Euphorbiaceae) da Amazônia Oriental brasileira. **Revista Brasil. Bot.** v.32, n.2, p.249-252, 2009.

SECCO, R. DE S. et al. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae *s.l.* in Brazil. **Rodriguésia**, 63(1), p. 227-242, 2012.

SECCO, R. DE S. et al. Euphorbiaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Orgs.). **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. p. 509-515.

SECCO, R. DE S.; BERRY, P. E. Novidades sobre a morfologia floral e distribuição geográfica de *Croton pycnadenius* Müll. Arg. (Euphorbiaceae s.s.). **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 11, n. 3, p. 297-300, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para a identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. Nova Odessa: SP, 3ed. Instituto Plantarum. 2012.

STACE, C. A. **Plant Taxonomy and Biosystematics**. 2ed. 1989.

THIERS, B. ***Index Herbariorum: a global directory of public 22 herbaria and associated staff***. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>> Acesso em: 15 Jan. 2016. 2016.

VAN EE, B. W.; RIINA, R.; BERRY, P. E. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** 60 (3) p. 791-823, 2011.

ZUCCHI, M. I.; CAVALLARI, M. M.; SIQUEIRA, M. V. B. M. A importância do conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética de populações e sua utilidade para a conservação e manejo de espécies vegetais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n.2, 2011.

WEBSTER, G. L. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. **Taxon**, 24 (5/6), p. 593-601, 1975.

WEBSTER, G. L. **Systematics of the Euphorbiaceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden, v.81. 1994. p. 1-144.

WOLFE, A. D.; XIANG, QIU-YUN; KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, 7, p. 1107-1125, 1998.

WURDACK, K. J.; HOFFMANN, P.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. **American Journal of Botany**, 92, p. 1397-1420, 2005.

WURDACK, K. J.; DAVIS, C. C. Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. **American Journal of Botany**, v. 96, n.8, p. 1551-1570, 2009.

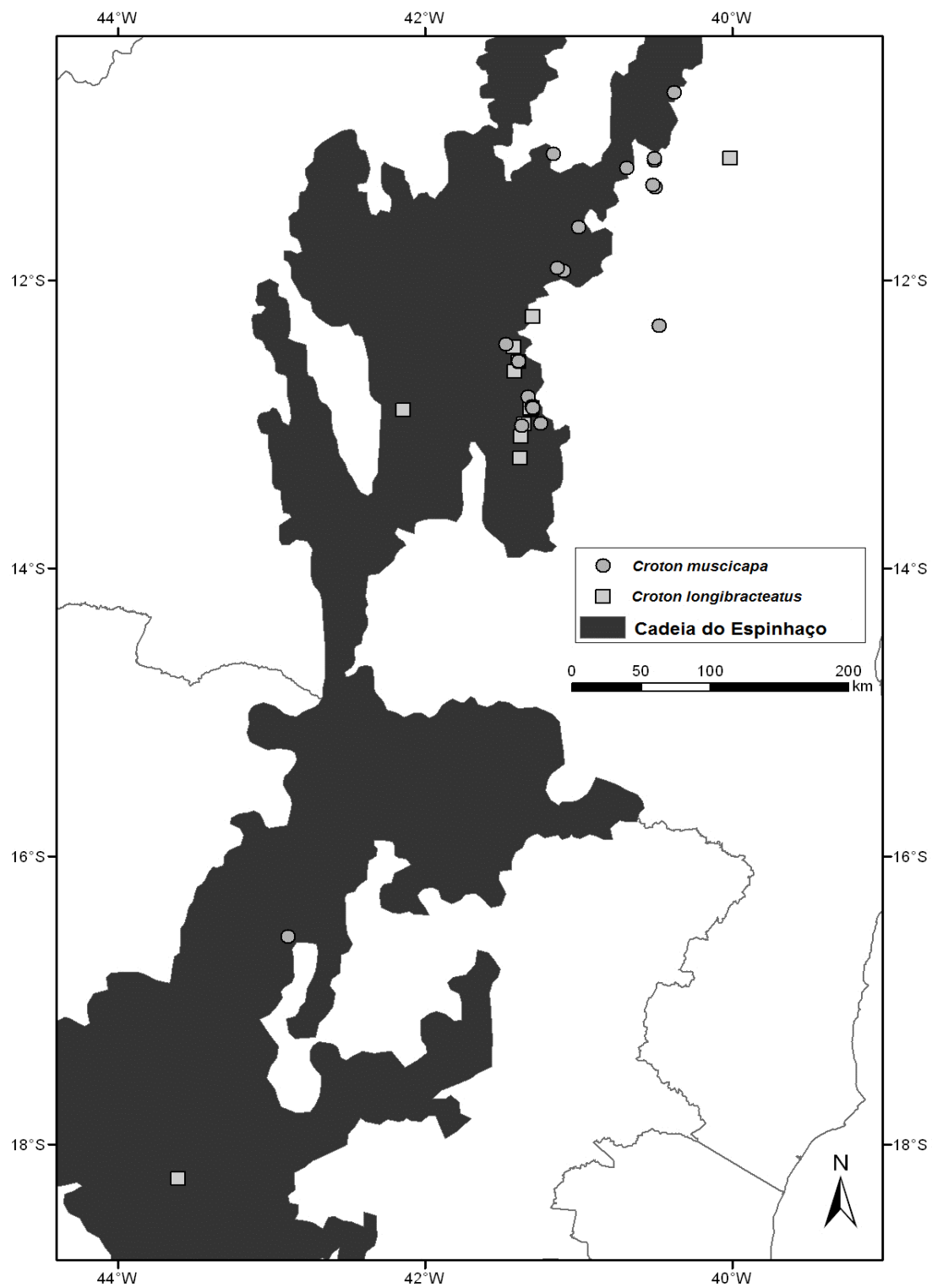


Figura 1. Mapa de distribuição geográfica das espécies *Croton muscicapa* Müll. Arg. e *Croton longibracteatus* Mart. Gord. & De Luna abrangendo os estados da Bahia e Minas Gerais.



Figura 2. *Croton muscicapa* Müll.Arg. **A-B.** Hábito. **C.** Flores estaminadas. **D.** Botões das flores estaminadas e flores pistiladas. *Croton longibracteatus* Mart.-Gord. & de Luna. **E-F** Hábito. **G.** Inflorescência com flores pistiladas e bractéolas. **H.** Inflorescência com estames exsertos. Foto: D.S. Carneiro-Torres, B.L. R. Barbosa.

Capítulo 1

Diferenciação morfológica e genética entre *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus* (Euphorbiaceae) da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes, Brasil: implicações taxonômicas e evidências de hibridação

Diferenciação morfológica e genética entre *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus* (Euphorbiaceae) da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes, Brasil: implicações taxonômicas e evidências de hibridação

B. L. R. Barbosa^{1*}, D. S. Carneiro-Torres^{1*}, I. L. C. Oliveira¹, C. van den Berg¹ & R. P. Oliveira^{1*}

*Autores para correspondência

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

barbararamos00@hotmail.com, dscarneiro@hotmail.com, rpatricia@uefs.br

Resumo

O gênero *Croton* é o segundo maior e mais diverso de Euphorbiaceae e muitas das suas espécies apresentam ampla variação nos caracteres vegetativos e florais. O presente trabalho analisou a diferenciação e as relações entre *C. muscicapa*, *C. longibracteatus* e morfotipos associados, pertencentes à seção *Barhamia* e ocorrentes ao longo da Cadeia do Espinhaço e áreas adjacentes no Brasil. Foram coletadas 11 populações que correspondem a cinco grupos morfológicos, os quais foram testados através de morfometria tradicional uni e multivariada, envolvendo 37 variáveis. Esses dados foram comparados aos perfis genéticos obtidos através de 116 loci polimórficos de marcadores ISSR. Os caracteres vegetativos foram muito mais variáveis que os reprodutivos e menos informativos para fins taxonômicos. As populações estudadas demonstraram alta estruturação e variabilidade baixa. Quatro grupos de populações foram reconhecidos pelos dois conjuntos de dados, dois deles correspondendo a *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, confirmadas como entidades taxonômicas distintas e endêmicas da Chapada Diamantina e áreas adjacentes, Bahia. Os outros dois grupos de populações incluem dois morfotipos endêmicos da região norte de Minas Gerais, um de Grão Mogol e Serranópolis e o outro de Jequitinhonha, e além da divergência morfológica e genética, também diferem pelas condições ecológicas, incluindo o tipo de vegetação e a altitude das áreas onde são encontrados. Para um deles a hipótese de hibridação foi confirmada pelo *pool* gênico compartilhado entre *C. longibracteatus* e população afim a *C. muscicapa*.

Palavras-Chave: Morfometria, *Croton*, variação, delimitação de espécies, diversidade

Euphorbiaceae é considerada a maior família da ordem Malpighiales (APG IV 2016). Ocorre predominantemente nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta e engloba ca. 6.300 espécies, distribuídas em 246 gêneros (Webster 1994, Wurdack e Davis 2009). No Brasil a família está representada por 64 gêneros e 948 espécies, distribuídas em diferentes tipos de vegetação (Cordeiro et al. 2015). Representa uma das principais famílias da flora brasileira (Lucena 2009, Sodr e et al. 2014) e é extremamente diversificada, incluindo árvores, arbustos, ervas ou lianas, geralmente com folhas alternas ou raramente opostas a verticiladas, principalmente com ovário súpero, trilocular e com um óvulo por lóculo (Secco et al. 2013).

Croton L.   o segundo maior e mais diverso g nero da família (Webster 1993, Lima e Pirani 2003), pertence   subfamília Crotonoideae. Inclui mais da metade das espécies desse grupo, cerca de 1.300 (Berry et al. 2005), ocorrentes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Webster 1993). Suas espécies geralmente são monóicas, raras dióicas, com tricomas muito variados (simples, estrelados, lepidotos e varia es destes), as inflorescências cont m flores pistiladas na base e estaminadas no ápice, os estames são encurvados no botão floral e as pétalas das flores pistiladas são reduzidas ou ausentes (Secco e Berry 2013).

Euphorbiaceae tem sido historicamente considerada como uma família bastante complexa e *Croton*   um bom exemplo de “g nero problema”, devido   ampla varia o na forma e comprimento das folhas, no indumento, aspectos da inflorescência e morfologia floral, além da ampla distribui o geográfica e o elevado número de espécies. Por esse motivo   taxonomicamente difícil e tem sido negligenciado em favor de gêneros menores e com delimita o mais clara (Burger e Huft 1995; Lima e Pirani 2008; Riina et al. 2009).

Uma das espécies desse g nero com limites imprecisos   *Croton muscicapa* Müll. Arg., descrita por Müller Argoviensis (1873) como parte da Flora Brasiliensis. A descri o original foi baseada em um único material (*Martius 2260*), coletado na "Serra do Gado Bravo" (localizada no estado da Bahia, Brasil) e cujo holótipo está depositado no herbário M

(M-0089109). Lima e Pirani (2003) ampliaram os limites de distribuição de *C. muscicapa* até Grão Mogol e Jequitinhonha, cidades localizadas no norte de Minas Gerais, e reconheceram diferenças em relação às populações da Bahia, principalmente relacionadas ao maior tamanho das flores e das brácteas, quantidade de glândulas nas margens das folhas, nas brácteas e nas sépalas das flores pistiladas.

Martínez Gordillo e de Luna (2005) descreveram *Croton longibracteatus* Mart.Gor. & de Luna, com base no material *Harley 22675* coletado em Lençóis, Bahia, holótipo depositado no herbário NY, com duplicatas em NMNH, UEC e CEPLAC (acrônimos segundo Thiers 2016). Como parte da descrição original, os autores ressaltaram que indivíduos dessa espécie eram anteriormente identificados sob *C. muscicapa*, e ainda, que ambas seriam restritas à Bahia, Brasil. Posteriormente, Carneiro-Torres (2009) e Cordeiro et al. (2015) confirmaram a ocorrência dessas espécies também no estado de Minas Gerais.

Segundo Martínez Gordillo e de Luna (2005), *Croton longibracteatus* difere de *C. muscicarpa* por apresentar brácteas, estípulas e sépalas da flor pistilada maiores e flores estaminadas com estames exsertos. Para Carneiro-Torres (2009), algumas dessas características se sobrepõem ao longo da distribuição geográfica das duas espécies, a exemplo dos estames exsertos e sépalas maiores nas flores pistiladas. Devido a tais variações, essa autora comentou da necessidade de estudos mais aprofundados nesse grupo, para maior certificação na delimitação dessas duas espécies.

As populações de *Croton longibracteatus* e *C. muscicapa* indicadas por Carneiro-Torres (2009) para áreas externas à Bahia foram oriundas exatamente da região norte de Minas Gerais, nos limites da Cadeia do Espinhaço ou em áreas adjacentes a essa região. Variações no tipo de vegetação onde as populações ocorrem também têm sido observadas, uma vez que *C. muscicapa* é indicada para áreas cobertas por florestas sazonalmente decíduais, caatinga, cerrados de altitude, campos limpos, florestas de grotão, florestas de

encostas e campos rupestres, enquanto *C. longibracteatus* ocorre em áreas de campos gerais e campos rupestres (Martínez Gordillo & de Luna 2005; Carneiro-Torres 2009). Também têm sido observados caracteres intermediários entre algumas dessas populações levando-nos a suspeitar da ocorrência de híbridos entre as amostras, embora a hibridação não seja um fenômeno tradicionalmente registrado em *Croton*.

Quantificar e compreender as causas da diferenciação populacional são tarefas fundamentais na avaliação dos limites entre as espécies, incluindo o conhecimento dos níveis de diferenciação entre e dentro das populações (Conesa et al. 2012). Nesse sentido, vários conjuntos de dados podem ser empregados, sendo os morfométricos um dos mais utilizados em plantas (Henderson 2006), fornecendo meios para descrição quantitativa, análise e a interpretação das variações da forma de certas estruturas (Rolfh 1990). Para Roth e Mercer (2000) estudos a partir de descrições quantitativas são capazes de reconhecer formas intermediárias e julgar o grau de proximidade ou semelhança entre as mesmas. Em Euphorbiaceae, estudos envolvendo morfometria têm sido utilizados com o intuito de observar diferenças e relações entre pares de espécies, sendo eficientes na resolução da taxonomia em diferentes gêneros, a exemplo de *Euphorbia* L. (Crompton et al. 1990), *Acalypha* L. (Soladoye et al. 2008) e *Jatropha* L. (Kolawole et al. 2016), os quais são pouco difundidos entre as espécies de *Croton*.

De maneira complementar, estudos de variabilidade genética também são ferramentas importantes para compreender as variações nas populações e os processos evolutivos que levam à diferenciação entre as espécies (Brammer 2002; Estopa et al. 2006; Silva 2008). Os organismos de maneira individual diferem nas sequências de DNA que compreendem seus genomas (Sunnucks 2000) e as propriedades genéticas de uma população podem ser modificadas por qualquer alteração que ocorra no processo de transmissão dos genes de uma geração para outra, gerando variações que podem ser influenciadas pela história de vida dos

indivíduos, incluindo sucesso reprodutivo, migração, tamanho da população, seleção natural, deriva genética e mutação (Sunnucks 2000; Salman 2007). Para que se realize esse tipo de estudo, são utilizados marcadores moleculares que permitem que sejam geradas grandes quantidades de informações sobre a identidade genética e variabilidade em cada população (Faleiro 2007). Entre os marcadores mais utilizados, os ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats, ver Wolfe et al. 1998) têm claramente um grande potencial em estudos de populações naturais de plantas. Trabalhos utilizando marcadores ISSRs também têm sido usados com sucesso em Euphorbiaceae, a exemplo do gênero *Plukenetia* L. (Rodríguez et al. 2010; Ocelák et al 2015) e também em *Croton* (Lira Neto 2011; Rocha et al. 2016), mas nenhum estudo similar enfocou o grupo aqui em questão.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as variações existentes entre *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus*, através de uma abordagem em nível populacional. O estudo emprega métodos de morfometria e marcadores ISSR visando compreender: 1) Se existe diferenciação substancial e quantificável entre as populações analisadas; 2) Quais são as suas relações, tanto do ponto de vista morfológico quanto genético; 3) Quais são os principais caracteres morfológicos e/ou ecológicos que definem os grupos formados; 4) Quais são os limites da distribuição geográfica de cada um deles; e 5) Se os morfotipos que apresentam caracteres divergentes correspondem a novas entidades taxonômicas.

Material e Métodos

Coleta e obtenção das amostras. Foram coletados indivíduos de onze populações em áreas ao longo da distribuição conhecida das espécies na Cadeia do Espinhaço, desde o estado da Bahia até o norte de Minas Gerais (Tab. 1, Fig. 1). As localidades visitadas foram escolhidas a partir das coordenadas geográficas encontradas nas exsiccatas analisadas no herbário da

Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS, acrônimo segundo Thiers 2016) e do site do Species Link (<http://smlink.cria.org.br/>).

As populações amostradas foram distribuídas em cinco grupos, baseados em caracteres morfológicos (Tab. 1; Fig. 2). Um deles englobou as populações mais similares ao material tipo de *C. muscicapa* (CM1, CM2, CM3); outro envolveu cinco populações semelhantes ao material tipo de *C. longibracteatus* (CL1, CL2, CL3, CL4 e CL5). As outras três populações correspondem a morfotipos que diferiram desses dois padrões, um deles englobando apenas a população CAM1, morfológicamente relacionada a *C. muscicapa*, porém com pilosidade destacada nos órgãos vegetativos e florais; outro englobou apenas a população CAM2, também similar a *C. muscicapa*, mas diferindo pela distribuição geográfica e maior número de estames; e o último morfotipo incluiu a população CAL, morfológicamente intermediária entre *C. muscicapa* e *C. longibracteatus* e também diferindo em sua distribuição geográfica.

Um total de 163 indivíduos férteis foi coletado, sendo 15 de cada população, com exceção da CAM2, com apenas 13 amostras. Folhas jovens de todos os indivíduos das onze populações também foram coletadas e armazenadas em sílica gel, visando o desenvolvimento das análises genéticas. Todos os materiais coletados foram submetidos a técnicas convencionais de coleta e herborização (Mori et al. 1989), e posteriormente depositados na coleção do HUEFS. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório de Taxonomia Vegetal (TAXON) da UEFS, e as análises genéticas no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL) da mesma instituição, onde estão depositadas as amostras de DNA total das plantas estudadas.

Análise Morfométrica. Foram examinados 37 caracteres vegetativos e reprodutivos, sendo quantitativos contínuos (30) e descontínuos (sete) (Tab. 2; Fig.3). Os caracteres foram selecionados a partir da análise de exsicatas e da literatura, os quais foram avaliados com o

auxílio de lupa e paquímetro digital, sendo todos os caracteres contínuos medidos em milímetro (mm) (Fig.3). Visando estabelecer critérios de homologia, tomou-se como base a mesma posição das estruturas analisadas entre os espécimes, e todas as amostras foram reidratadas para facilitar a tomada das medidas.

Os dados obtidos foram organizados em planilhas, com formato compatível com as matrizes a serem utilizadas nos programas estatísticos e foram submetidos ao Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk). Foram realizadas análises de Variáveis Canônicas (CVA) e Agrupamento para três conjuntos de dados: um apenas com as variáveis vegetativas; outro apenas com as reprodutivas e outro com todas as variáveis. Tais análises foram realizadas utilizando o STATISTICA para Windows versão 10.0 (StatSoft 2010), sendo as populações usadas como grupos. Para as análises de agrupamento foi utilizada a Distância generalizada de Mahalanobis, tendo o UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetical Averages) como algoritmo de agrupamento (Sneath e Sokal 1973). Também foi realizada uma Análise de Variância para cada uma das 37 variáveis dos cinco morfotipos (ANOVA ONEWAY), sendo verificada a diferença significativa usando o teste de Tukey, com probabilidade de 5%. Os resultados obtidos foram comparados às descrições das espécies através dos trabalhos de Müller Argoviensis (1873) para *C. muscicapa* e Martínez Gordillo & de Luna (2005), para *C. longibracteatus*, além do trabalho de Carneiro-Torres (2009) para as duas espécies.

Análise genética – Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) para amostras coletadas e armazenadas em sílica, modificado de Doyle e Doyle (1987), com tampão CTAB 2% e purificação através de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) adaptado para microtubos. Após a extração foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com tampão Borato de Sódio

- SB (Brody e Kern 2004), para cada amostra. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotodocumentados em transiluminador com luz ultravioleta.

Foram realizados testes para verificação de polimorfismos com 13 *primers* indicados por Wolfe et al. (1998) incluindo um representante de cada população. O perfil de cada *primer* foi observado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, sendo selecionados para a análise os oito *primers* mais polimórficos (Tab. 3). Após a seleção dos *primers*, cada fragmento foi amplificado através do kit Top Taq Master Mix (Qiagen Quality), para todos os indivíduos. Foi utilizado para cada reação 4,0 uL de Top Taq, 2,24 uL de H₂O, 0,64 uL de corante, 0,32 uL de *primer* e 1uL do DNA da amostra, com um volume total de 7,2 uL.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Escohealthcare, Swift MaxPro), onde iniciaram com um ciclo de destanuração à 94° C por 1 min. e 30 seg., seguidos de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 seg., anelamento do primer por 45 seg. com diferentes temperaturas entre os *primers* (sendo para UBC 843, UBC 844, Becky, Jhon e Mao 48°C; para Manny, Terry e ISSR 6, respectivamente 51.7°C, 54.8°C e 49.2°C), e extensão a 72°C durante 1 min. e 30 seg.. Logo em seguida, foram realizados mais dois ciclos de amplificação a 94°C e 44°C por 45 seg., e uma extensão final de 72°C durante 7 min..

Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1,5%), na presença de marcador 100 pb Ladder (Invitrogen). Para cada corrida, foi usado tampão SB 1X durante 2 horas, e após este processo os géis foram submetidos a banho de brometo de etídio durante 40 minutos para coloração das bandas, seguido pela fotodocumentação em transiluminador com luz ultravioleta. Somente as bandas com boa visibilidade e não ambíguas foram selecionadas para as análises. Esses dados foram inseridos no software GelCompar II versão 5.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium), obtendo-se uma matriz binária de valores zero (ausência) e um (presença) de dados obtidos para cada loci, e -1 (ou -9, dependendo do software a serem realizadas as análises) para os dados faltantes.

Foi realizado o cálculo da relação genética entre pares de indivíduos, através do estimador de relação genética de Ritland (1996), sendo medida a proporção de alelos idênticos por descendência entre pares de indivíduos. Também foi calculado o número de bandas exclusivas de cada população e a partir das frequências alélicas, estimados os parâmetros de variabilidade: heterozigidade esperada (H_e) (Lynch e Milligan 1994), Índice de Shannon (I) (Lewontin 1972) e porcentagem de loci polimórficos (%P) (critério 0,95). Uma matriz de identidade genética (Nei 1978) foi gerada para análise da similaridade entre as populações. Para avaliar o grau de estruturação genética entre as populações foi utilizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). Todas essas análises foram realizadas pelo software GenAlEx 6.0 (Peakall e Smouse 2006).

Através dos softwares AFLPsurv 1.0 (Vekemans 2002) e PHYLIP 3.69 (Felsenstein 2011) foram feitas ainda análises de agrupamento, a partir da matriz de distância genética não enviesada de Nei (Nei 1978), e foi possível identificar também com o AFLPsurv 1.0 (Vekemans), o valor da heterozigidade total (H_t). O dendrograma obtido foi visualizado através do FigTree v. 1.2.2 (Rambaut 2009), a partir de método de agrupamento Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987).

No Structure 2.3.3 (Printchard et al. 2000) foi realizada uma análise bayesiana a partir dos dados dos genótipos, para a inferência dos *pool* gênicos, de migrantes e de indivíduos miscigenados, através das frequências alélicas das populações pressupondo que cada indivíduo teve ascendência a partir de uma única população. O algoritmo básico utilizado foi descrito por Printchard et al. (2000), com extensões publicadas por Falush et al. (2003, 2007) e Hubisz et al. (2009).

Resultados

Diferenciação morfológica. As matrizes de classificação obtidas a partir da análise discriminante indicaram que quando avaliadas somente as variáveis vegetativas (Tab. 4) a classificação correta de indivíduos foi baixa, entre 40% a 86,66%. As classificações incorretas ocorreram em sua maioria dentro do mesmo morfo, e dentre as classificações incorretas mais marcantes estão a população CAL, com indivíduos classificados em todos os outros morfos (CL5, CAM1 e CM2), exceto CAM2. Indivíduos de CAM1 foram classificados incorretamente em CM2; de CM1, CM2 e CM3 em CAM2, assim como de CAM2 nas mesmas populações. Todos os indivíduos de *C. longibracteatus* foram classificados corretamente dentro desse morfo, com exceção de um único indivíduo de CL4 classificado em CM1.

Quando analisados apenas os dados reprodutivos (não mostrados) e todas as 37 variáveis agrupadas (Tab. 5), as classificações corretas foram muito mais evidentes, variando de 86,66% a 100% e 93,33% a 100% respectivamente. Nesses casos, os indivíduos classificados incorretamente foram posicionados dentro do mesmo morfo, tanto na análise apenas com dados reprodutivos quanto na combinada, sendo também classificados mais corretamente dentro de suas populações, com poucas exceções, a exemplo de um indivíduo de CM3 classificado em CM2 e um de CL5 classificado em CL1.

A partir da análise de CVA com dados vegetativos (Fig. 4A), foi observada a separação de dois grupos no eixo 1, o primeiro formado pelas populações de *C. longibracteatus* (à esquerda do gráfico), e o segundo pelas populações de *C. muscicapa* + demais populações (CAM1, CAM2 e CAL) (à direita). A população CAL teve posição intermediária entre esses dois grupos, com certa sobreposição especialmente com a população CAM1 (Fig. 4A). Essa separação dos grupos no eixo 1 é principalmente devida ao comprimento da estípula (#9) e comprimento do limbo (#1) (Tab. 6). Nos eixos 2 (Fig. 4A) e

3 (Fig. 4B) não houve uma separação clara das populações, sendo demonstrada grande sobreposição, especialmente entre a população CAL, com relação a CAM1 e CM2.

Os resultados das análises com dados reprodutivos (não mostrados) foram similares aos encontrados na análise com os dados combinados, com a clara formação de quatro grupos, tendo em vista os eixos 1, 2 e 3 (Fig. 5A-B). No eixo 1 (Fig. 5A) observa-se a separação das populações de *C. longibracteatus* (à esquerda), com relação às de *C. muscicapa*, CAM1 e CAM2 (à direita), tendo a população CAL novamente como intermediária. As variáveis que mais influenciaram a separação nesse eixo foram: largura de $\frac{1}{4}$ da bractéola da flor pistilada, comprimento do pedicelo da flor pistilada e a largura de $\frac{1}{2}$ do limbo (#19, #32 e #3, respectivamente) (Tab. 6).

No eixo 2 (Fig. 5A) foi evidente a separação da população CAM2 e CAL (à direita, no lado superior do gráfico). As variáveis que mais influenciaram esse eixo foram a largura de $\frac{3}{4}$ (base) do limbo, quantidade de glândulas na sépala da flor pistilada e número de estames (#4, #35 e #29) (Tab. 6). E no eixo 3 foi observada especialmente a separação da população CAM1 das de *C. muscicapa* (Fig. 4B), influenciadas especialmente pelo número de estigmas, largura de $\frac{2}{4}$ do limbo e largura de $\frac{2}{4}$ da bractéola da flor estaminada (variáveis #36, #3 e #15, respectivamente).

Os dendrogramas apresentados na Fig. 6 refletem basicamente a ocorrência dos mesmo grupos revelados através da CVA. Utilizando apenas dados vegetativos (Fig. 6A) foram verificados dois agrupamentos principais, um primeiro reunindo as populações de *C. muscicapa* + as populações CAM1, CAM2 e CAL, e o segundo grupo foi formado pelas populações de *C. longibracteatus*. Dentro do primeiro agrupamento, os subgrupos formados incluem CAM1 + CAL, além de *C. muscicapa* + CAM2. Os dendrogramas obtidos através dos dados reprodutivos (não mostrados) e da análise combinada (Fig. 6B) foram muito similares, formando dois grupos principais, um reunindo as populações de *C. muscicapa*,

CAM1 e CAM2, e o outro reunindo as populações de *C. longibracteatus* + CAL. Porém, as populações CAM2 e CAL foram as que apresentaram menor similaridade dentro dos seus respectivos grupos.

Variabilidade e estruturação genética. Através dos oito *primers* analisados foram detectados 116 loci polimórficos, tendo uma média de 14,5 loci/primer. O número de loci por população variou de 50 (CAM2) a 88 (CM3), tendo uma média de 76,27 (Tab. 7). O percentual médio de loci polimórficos (%P) encontrado para as populações analisadas variou de 30,17% (CAM2) a 70,69% (CL1), com uma média de 55,72% (Tab. 7). A percentagem de heterozigosidade esperada variou de 8,8% (CAM2) a 22,30% (CL1), com uma média de $H_e=16,50\%$ (Tab. 7). O Índice de Shannon indicou a CL1 como sendo a mais variável geneticamente ($I= 34,3\%$, $\%P= 70,69\%$, $H_e= 22,30\%$), enquanto CAM2 ($I= 13,70\%$, $\%P= 30,17\%$, $H_e= 8,8\%$) e CM2 ($I= 18,2\%$, $\%P= 44,83\%$, $H_e= 11,30\%$) foram as menos variáveis (Tab. 7). O valor da heterozigosidade média total encontrada foi de $H_t= 0,271$. Para o presente estudo não houve nenhuma população com locus exclusivo (Tab. 7).

Os valores de similaridade genética entre as populações, observados na tabela 8 demonstram que as populações mais próximas geneticamente foram CL4 e CL5 (0,956) de *C. longibracteatus*, ambas de Lençóis - Bahia, enquanto as mais distantes geneticamente foram CM3 (*C. muscicapa*) e CL5 (*C. longibracteatus*) (0,712) coletadas em Palmeiras e Lençóis, respectivamente, e todas essas localidades são incluídas na Chapada Diamantina, na Bahia. Na análise de agrupamento a partir da distância de Nei (Fig. 7) foi observada a formação de dois grupos principais, um formado pelas populações de *C. longibracteatus* e outro grupo com as populações *C. muscicapa* + CAM1 e CAM2. A população CAL ocupa uma posição intermediária entre os dois grupos, separada com um suporte de 100%.

A análise de variância molecular (AMOVA) indicou a existência de 59% de variabilidade dentro das populações e 41% de divergência entre elas (Tab. 9). A estruturação genética dos grupos reveladas pelo STRUCTURE, indicou um primeiro ΔK com dois *pools* gênicos (dados não mostrados), separando um grupo com as populações de *C. muscicapa* + CAM1 e CAM2, e um outro grupo com as populações de *C. longibracteatus* + CAL. Porém, o gráfico de ΔK evidenciou um outro grande pico com a ocorrência de quatro *pool* gênicos (Fig. 8), sendo um com duas populações de *C. muscicapa* (CM1 e CM2) + CAM1 (amarelo); outro com CM3 (azul); um outro com CAM2 (verde), e o quarto grupo com as populações de *C. longibracteatus* + CAL (vermelho). Embora a população CAL seja aparentemente pertencente a este grupo, existe uma clara mistura dos seus indivíduos com a população CAM2.

Discussão

Estruturação genética, morfológica, geográfica e ecológica entre as populações.

Historicamente, diferenças morfológicas têm servido como base para as hipóteses taxonômicas que podem ser testadas e validadas através de outros conjuntos de dados, incluindo os genéticos (Hausdorf & Hennin 2010). As espécies de *Croton* sect. *Barhamia* aqui analisadas são amplamente caracterizadas tanto pelas estruturas vegetativas quanto florais, e variações nesses caracteres, especialmente dimensões das flores pistiladas e estaminadas, além da pilosidade das mesmas, tem sido a base para sua identificação, mas também para as dúvidas sobre os limites de algumas das suas espécies. Segundo Carstens et al. (2013), um importante ponto de partida para investigações sobre delimitação específica tem sido a análise de estruturação populacional, conforme empregado no presente trabalho.

A estruturação genética entre as populações aqui analisadas, detectada a partir da AMOVA (41%), informa que existe divergência considerável entre as mesmas, quando

comparadas a resultados com ISSR para outras famílias de Eudicotiledôneas com menores valores, a exemplo de Caryocaraceae, em *Caryocar brasiliense* Camb. (13,03%, ver Fernandes 2008) e Lamiaceae, em espécies de *Salvia* L. (21%, Safaei et al. 2016), além de outros grupos de Euphorbiaceae, a exemplo de *Plukenetia volubilis* L. (36%, Ocelák et al. 2015). Segundo Slatkin (1994) e Duminil & Di Michelli (2009), a alta estruturação entre populações implica informar que estamos trabalhando com mais de uma espécie entre as populações estudadas, o que corrobora a análise de estruturação genética que indicou um ΔK com quatro *pools* gênicos, inferindo uma diferenciação genética entre as populações de *C. muscicapa*, *C. longibracteatus* + CAL, CAM2 e CM3.

Para a análise morfológica, os dados da matriz de classificação informaram que os caracteres vegetativos foram mais variáveis, e por esse motivo, forneceram informações menos confiáveis a respeito da diferenciação existente entre as populações. Por esse motivo, podem ser considerados menos úteis para propostas taxonômicas no grupo estudado, especialmente se analisados isoladamente, sem associação com os caracteres reprodutivos. Segundo Alencar (1998), as estruturas reprodutivas das plantas sofrem menos alterações com as modificações do ambiente, e por isso tradicionalmente são as mais utilizadas na elaboração dos sistemas de classificação.

A partir dos dados morfológicos aqui analisados, foi observado que as populações de *Croton longibracteatus* diferem consistentemente pelas maiores dimensões em relação às populações de *C. muscicapa*. Isso corrobora toda a discussão de Martínez Gordillo e de Luna (2005) quando segregaram essas duas espécies em entidades independentes. Assim, as variáveis apresentadas (#19 largura de $\frac{1}{4}$ da bractéola da flor pistilada, #32 comprimento do pedicelo da flor pistilada e #3 largura de $\frac{1}{2}$ do limbo) e que forçaram a separação das duas espécies, são justificáveis, pois se apresentam menores em *C. muscicapa*, com exceção da variável #32. Antes mesmo da descrição formal de *C. longibracteatus*, essa diferenciação já

havia sido observada por Lima & Pirani (2003), consideradas, porém, como variações intraespecíficas dentro de *C. muscicapa*, que apresenta ainda estípulas tipicamente em formato de cacho de uvas.

A população CAM1, coletada em Jacobina, Bahia, não pode ser considerada distinta de *Croton muscicapa* através da análise de estruturação genética, mas do ponto de vista morfológico ela apresenta caracteres mais divergentes dentro dessa espécie. Isso levou ao reconhecimento da mesma em um morfotipo à parte durante as coletas, tendo alguns caracteres vegetativos e florais, relativamente maiores aos encontrados nas demais populações dessa espécie. A grande quantidade de tricomas encontrados em seus indivíduos, principalmente nas folhas, também se contrapõe ao que é considerado padrão para essa espécie, que normalmente é glabra a glabrescente. Burger & Huft (1995) reconheceram a ocorrência de variações em determinadas estruturas dentro de espécies de *Croton*, especialmente ligadas ao indumento. Análises prévias dos tricomas em espécies de *Croton* seção *Barhamia* (Martínez Gordillo & Espinosa Matías 2005), já haviam constatado a ocorrência de indivíduos com indumento na face abaxial das lâminas foliares em *C. muscicapa*, assim como indivíduos glabros em ambas as superfícies. Esses autores ainda discutiram a grande variação na densidade de tricomas, o que demonstra a pouca utilidade de tais caracteres na delimitação de espécies desse grupo.

Ao contrário, separar a população CAM2, de Grão Mogol, Minas Gerais, Brasil, em um morfotipo à parte de *Croton muscicapa* em princípio poderia parecer inviável, pois possuía vários caracteres compartilhados, incluindo estípulas em forma de cacho de uvas e indivíduos glabros, semelhantes às demais populações de *C. muscicapa*. Porém, a mesma foi bastante distinta nas análises de estruturação genética e pelo número elevado de estames (15-17), justificando a sua separação. Segundo Van Ee et al. (2011) as espécies de *Croton* seção *Barhamia* possuem de (3-) 8-15 (-20) estames, mas o número observado nessa população

difere totalmente de todos os registros disponíveis na literatura para *C. muscicapa*, com apenas 11 a 12 estames.

A população CAM2 também difere das de *Croton muscicapa* pelo destacado isolamento geográfico e pelas condições ecológicas da sua ocorrência. Através do presente estudo a distribuição de *Croton muscicapa* se confirmou como exclusiva da Chapada Diamantina e áreas adjacentes, na Bahia, em florestas estacionais e caatinga, em altitudes de 593m a 740m (Tab. 1). Porém, CAM2 foi coletada em Grão Mogol, no norte de Minas Gerais e é similar a outras amostras obtidas em Serranópolis de Minas, ambas em vegetação de campo rupestre, em altitudes entre 873-1100m. Tal isolamento geográfico e ecológico pode estar influenciando o processo de especiação nesse grupo, funcionando como obstáculos ao fluxo gênico entre tais populações (Turelli et al. 2001; Rieseberg & Willis 2007) e explicando a estruturação genética observada, justificando também a diferenciação morfológica, mesmo que ainda pequena.

Dentro de *Croton muscicapa*, a única população a apresentar-se em um *pool* gênico diferente foi a CM3, de Palmeiras, Bahia, mas sem caracteres morfológicos divergentes em relação às demais populações coespecíficas. Provavelmente, barreiras ecológicas comuns a plantas ocorrentes na Chapada Diamantina estão atuando no isolamento desta população em relação às demais, o que será melhor discutido no item de variabilidade das populações. Por outro lado, todas as populações de *C. longibracteatus*, coletadas apenas na Chapada Diamantina, demonstraram grande coesão genética e morfológica em relação às demais populações analisadas.

Estruturação x hibridação entre as amostras. O exemplo mais interessante de estruturação dentre as amostras diz respeito à população CAL. Através da análise de amostras previamente depositadas em herbário, acreditava que se tratava de *C. longibracteatus*, devido a alguns

caracteres muito semelhantes a essa espécie, como o formato lanceolado das estípulas, a pilosidade nas estruturas vegetativas e reprodutivas e a margem do limbo denteada. Porém, durante as expedições de campo, foi possível detectar muitos caracteres morfológicos semelhantes a *C. muscicapa* e à população CAM2, como o menor tamanho das bractéolas, das flores estaminadas e pistiladas levando a suspeitar que esse material pudesse ser um híbrido natural. Além disso, foi possível verificar que esse material possuía as sépalas com uma grande quantidade de glândulas, como em *C. longibracteatus*, porém as mesmas eram curto-estipitadas, enquanto que *C. longibracteatus* apresenta glândulas longo-estipitadas e a CAM2 curto-estipitadas apenas na margem da sépala.

As análises morfométricas indicaram a população CAL como intermediária entre as populações de *C. longibracteatus* e *C. muscicapa* + CAM1 e CAM2, e as análises de estruturação genética indicaram a mesma como tendo *pool* gênico misturado entre *C. longibracteatus* e CAM2. Para Blackstock e Ashton (2010) e Mallet (2007) a hibridação em plantas vasculares é considerada um fenômeno comum e de importância evolutiva considerável, sendo o processo de "especiação híbrida" determinando a origem de novas espécies. Egan (2015) afirmou que tradicionalmente imagina-se que a hibridação resulta em caracteres morfológicos intermediários, o que nem sempre acontece, já que muitas vezes a hibridação pode produzir combinações morfológicas a partir dos caracteres dos parentais ou até mesmo caracteres novos e divergentes. Ainda de acordo com Egan (2015), a utilização de técnicas morfométricas multivariadas não conseguem distinguir entre divergência e hibridação. Mas os marcadores ISSR confirmaram a ocorrência de hibridação, através da detecção de *pool* gênico misto entre as referidas populações.

Segundo Baack e Rienseberg (2007) a hibridação é um evento que também pode levar à especiação, e nesse caso a nova linhagem híbrida pode tornar-se reprodutivamente isolada das populações parentais. De forma geral, para que ocorra hibridação, espera-se a ocorrência

de atributos que facilitem o fluxo gênico interespecífico, incluindo a ocorrência de caracteres florais pouco divergentes, sobreposição na distribuição e no período de floração. Foi observado que a estrutura floral de *C. longibracteatus* e da população CAM2 é bastante semelhante, divergindo apenas pelo tamanho das flores, que são menores em CAM2. Além disso, possivelmente apresentam sobreposição na floração, pois segundo Martínez Gordillo & de Luna (2005) indivíduos de *C. longibracteatus* podem ser encontrados com flores em diferentes estágios de desenvolvimento praticamente durante o ano todo.

Pelo menos com base nas populações conhecidas até o momento, a distribuição geográfica e as condições ecológicas de ocorrência dessas populações não se sobrepõem, o que poderia apontar para a ocorrência de fluxo gênico apenas histórico entre as populações, pelo menos em princípio. *Croton longibracteatus* ocorre exclusivamente em áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, a parte norte da Cadeia do Espinhaço da Bahia, em altitudes de 780m a 1.021m. A população CAM2 ocorre no Espinhaço, mas em Minas Gerais, na região de Grão Mogol, também em vegetação de campo rupestre. A população CAL apresenta-se fora dos limites do Espinhaço, no município de Jequitinhonha, norte de Minas Gerais, em uma área dominada pela vegetação de cerrado de altitude a ca. 1.088m. Assim, a população geograficamente mais próxima da CAL é a CAM2, distante ca. 190 km. Porém, outras populações podem ocorrer entre as mesmas, as quais serão alvo de esforços futuros de coletas, para confirmação da possível ocorrência de fluxo gênico atual entre as populações.

Diversidade genética e relações entre as populações. Grupta et al. (2008) consideraram os marcadores ISSR como uma poderosa ferramenta para a determinação da diversidade genética em plantas e estes têm sido aplicados com sucesso em espécies de Euphorbiaceae. Os 116 loci polimórficos gerados a partir dos oito *primers* utilizados no presente estudo estão dentro do esperado para esses marcadores por Colombo et al. (1998), que argumentaram sobre a

necessidade de uma quantidade média aproximada de 50 a 100 loci polimórficos para a obtenção de uma estimativa confiável das relações genéticas entre populações através de marcadores dominantes. Lira Neto (2011) utilizaram 17 *primers* de ISSR em três espécies de *Croton*, sendo detectados 317 loci polimórficos de um total de 327 loci, indicando que esses marcadores são de fato muito úteis na detecção da diversidade genética no grupo.

O número de loci polimórficos (%P) tem sido utilizado como uma das medidas principais da diversidade genética populacional por vários autores (Ge & Sun 2001; Palmquist et al. 2015). A média de loci polimórficos encontrada para o trabalho foi de 55,72%, significando que as populações analisadas possuem variabilidade de baixa a mediana, quando comparados com resultados de outros trabalhos em Euphorbiaceae, a exemplo de Ocelák et al. (2015), que encontraram níveis um pouco mais altos, ca. 66,89% em *Plukenetia volubilis* L., utilizando o mesmo marcador. E ainda, Oliveira et al. (2015) que utilizaram marcadores AFLP em populações de *Croton antisiphiliticus* Mart., e detectaram polimorfismo muito mais alto, ca. 86,60%.

A heterozigosidade média total (Ht) das amostras do presente estudo foi de 0,271, um valor considerado baixo quando comparado a outras Eudicotiledôneas, a exemplo de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish (Estopa et al. 2006), com Ht = 0,40. A variação da heterozigosidade esperada (He) aqui foi de 0,088 (CAM2) a 0,223 (CL1), sendo um valor muito abaixo da primeira população em relação ao encontrado na segunda. Isso também foi visualizado a partir do Índice de Shanon (I), que confirmou que as populações com menor e maior variabilidade genética, são respectivamente, CAM2 e CL1. Segundo Nybom (2004), marcadores ISSR aplicados a populações naturais podem inferir heterozigosidade média esperada (He) de 0,22. Dessa forma, as populações aqui estudadas estão abaixo desse valor, exceto a CL1 (de *C. longibracteatus*).

O comportamento reprodutivo é um dos fatores que pode explicar essa baixa variabilidade, mas estudos nesse sentido ainda são desconhecidos para as espécies aqui analisadas. Em outras espécies de *Croton*, a exemplo *C. urucurana* Baill. (Pires et al. 2004) foram citados insetos variados, incluindo Diptera, Odonata, Lepidoptera, Hemiptera e Hymenoptera (Apidae e Vespidae) como visitantes florais, sendo abelhas os visitantes mais frequentes. Acredita-se que os polinizadores das espécies em estudo sejam similares, uma vez que a estrutura floral é relativamente uniforme no gênero. O grupo também carece de estudos sobre dispersão das sementes, que pode ser ocasionada pela deiscência explosiva dos frutos, caracterizando síndrome de dispersão autocórica e pelo carregamento através de formigas que são atraídas pela carúncula presente nas sementes. O fato dessas espécies possuírem polinização e dispersão através de insetos que não percorrem longas distâncias propicia a diminuição do fluxo gênico entre indivíduos de outras populações que estão localizadas a distâncias maiores entre si, e assim favorece a alta estruturação genética populacional, bem como a baixa variabilidade das populações encontradas.

Embora as populações ocorram em unidades de conservação, o que poderia favorecer a ocorrência de níveis mais elevados de diversidade, ainda não foram encontradas, até o momento, outras populações com caracteres similares à CAM2 e CAL. Para a população CAM2, onde foram encontrados os menores valores de heterozigosidade esperada, foi encontrado uma quantidade pequena de indivíduos na população, o que pode explicar também essa baixa variabilidade (Nybom 2004). Isso pode apontar para a ocorrência de cruzamentos endogâmicos, por isso é aqui indicada a necessidade de estudos mais detalhados sobre aspectos reprodutivos no grupo.

A baixa variabilidade da população CAM2 também pode ser explicada pela mesma estar isolada geograficamente em Grão Mogol, Minas Gerais, a contrário das populações de *C. lonbigracteatius*, por exemplo, que ocorrem próximas umas das outras na Bahia. O valor da

porcentagem de loci polimórficos apresentado para a mesma que também foi o mais baixo (30,17%) entre as 11 populações analisadas, está relacionado ao distanciamento geográfico. Já a população CL1, pertencente a *C. longibracteatus*, localiza-se numa área de grande diversidade da sua espécie, Chapada Diamantina, Bahia, e isso facilita o fluxo gênico entre as populações, aumentando assim a diversidade e variabilidade dessas populações.

A partir da matriz de Identidade genética de Nei (1978) foi possível verificar o relacionamento das populações, sendo as mais similares geneticamente CL4 e CL5 (0,956), de *C. longibracteatus*, ambas de Lençóis – BA, pertencentes à mesma espécie e muito próximas geograficamente. Ao contrário, a menor similaridade genética foi encontrada entre CM3 e CL5 (0,712) de Palmeiras e Lençóis, respectivamente, que também são muito próximas geograficamente, mas pertencem a espécies diferentes (*C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, respectivamente), nas quais o isolamento genético parece estar sendo mantido de maneira eficiente.

Para Rieseberg & Willis (2007), isolamentos ecogeográficos funcionam como poderosas barreiras reprodutivas entre as plantas, o que é aqui confirmado para as espécies analisadas. Dentre as barreiras ao fluxo gênico interespecífico favorecendo o isolamento de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, endêmicas da Chapada Diamantina, assim como das demais populações ocorrentes em Minas Gerais, aqui reconhecidos como diferentes morfotipos (CAL e CAM2) estão as diferentes condições geográficas e ecológicas. Especificamente no caso da população CM3, o isolamento em relação às demais populações da sua espécie pode ser devido aos mesmos atributos, estando esta localizada em área de caatinga em menores altitudes, enquanto que as demais populações da sua espécie são típicas de áreas de floresta estacional. A partir do isolamento genético e ecológico já detectado, é possível que especiação já esteja ocorrendo e que uma futura diferenciação morfológica venha a ocorrer.

Implicações dos dados para a taxonomia do grupo. Embora as espécies de plantas sejam tradicionalmente circunscritas com base em diferenças morfológicas, a inclusão de dados moleculares e ecológicos nos últimos anos têm proporcionado mais evidências para sua delimitação (Piedra-Malagón et al. 2011). Os resultados das análises morfométricas aqui apresentados contribuíram para evidenciar a separação das populações, e em conjunto com os dados de estruturação genética, geográfica e ecológica, inferem a existência de quatro grupos taxonômicos. O primeiro inclui as populações de *C. muscicapa* + CAM1; o segundo as de *C. longibracteatus*; o terceiro a população CAM2, e o quarto a população CAL. Os dois últimos são novos táxons encontrados no estado de Minas Gerais, Brasil (ver Barbosa et al. in prep). Embora *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus*, descritas respectivamente por Müller Agoviensis (1873) e Martínez Gordillo & de Luna (2005) sejam espécies distintas, seus limites necessitam de revisão, com base nos seguintes argumentos:

1. *C. muscicapa*: Agrega as populações CAM1, CM1, CM2, CM3. São arbustos ca 1-2m, látex incolor, ramos de glabro à pilosos; limbo com 16.23-66.81x14.56-51.40 mm, ovado com ápice agudo e base cordada, faces de glabra à pubescente, tricomas sendo estrelados, margem serrilhada possuindo de uma à três glândulas em cada serra, pecíolo glabro à hirto-pubescente 9.92-44.01 mm, estípulas glanduliforme semelhante a um cacho de uva 0.55-1.91 mm; inflorescência 14.25-109.32 mm de glabra a pilosa; bractéolas em forma lanceolada com glândulas estipitadas, tendo a bractéola da flor estaminada 0.94-3.58mm de compr. e a da flor estaminada 0.82-5.79 mm; flores estaminadas 4.02-6.84 mm, pedicelos 1.85-5.94 mm, 5 sépalas lanceoladas com 2.66-4.88 x 1.21-2.91 mm, 5 pétalas ovadas com 2.88-5.47 x 1.86-3.94 mm compr., 11-12 estames; Flor pistilada 5.17-10.10 mm compr., pedicelo 2.85-12.16 mm compr., 5 sépalas 4.42-10.57 x 0.99-2.39 mm, de glabra a pubescente, com três estiletos, nove à 15 estigmas. Ocorre em florestas estacionais e caatinga no estado da Bahia, Brasil, com altitude de 593-740 m (Tabela 1 e 2, Fig. 2 e 8).

2. População CAM2: Muito semelhante a *C. muscicapa*, porém identificada como novo táxon para o gênero *Croton* (Barbosa et al, in prep. Cap.2). Difere de *C. muscicapa* por apresentar maior quantidade de estames, entre 15–17, possuir as flores pistiladas menores, 3.58-6.22 mm, e ocorrer em campo rupestre no estado de Minas Gerais, Brasil, com altitude de 873m (Tabela 1 e 2, Fig. 2).

3. *C. longibracteatus*: Agrega as populações CL1, CL2, CL3, CL4, CL5. São arbustos ca 1-3m, látex alaranjado, ramos hirtos-pubescentes a pubescentes; limbo com 21.41-98.73 x 15.52-51.99 mm, ovado com ápice acuminado e base cordada a subcordada, face adaxial glabrescente, face abaxial de glabrescente à pubescente, tricomas sendo estrelados, margem denteada possuindo de uma glândula em cada dente, pecíolo hirtos-pubescente 7.59-43.53 mm, estípulas glanduliformes em formato lanceolado 1.49-5.52 mm; inflorescência 20.83-138.06 mm hirtos-pubescente; bractéolas em forma lanceolada com glândulas longo-estipitadas, tendo a bractéola da flor estaminada 3.76-12.18 mm de compr. e a da flor pistilada 5.02-18.67 mm; flores estaminadas 6.09-11.09 mm, pedicelos 1.13-6.83 mm, 5 sépalas lanceoladas com 3.28-5.67 x 1.45-3.61 mm, 5 pétalas ovadas com 2.16-6.14 x 1.31-3.85 mm compr., 11-12 estames 5.77-11.52 mm; Flor pistilada 8.89-17.71 mm compr., pedicelo 0.86-5.90 mm compr., 5 sépalas 9.63-17.90 x 0.84-3.32 mm, pilosa, com três estiletos, seis a 13 estigmas. Ocorre em campo rupestre no estado da Bahia, Brasil, com altitude de 780-1021 m (Tabela 1 e 2, Fig. 2 e 8).

4. População CAL: Muito semelhante a *C. longibracteatus*, mas identificada como um novo táxon para o gênero *Croton* (Barbosa et al. In prep. Cap2), correspondendo a um híbrido natural entre *C. longibracteatus* e a população CAM2. Difere de *C. longibracteatus* por apresentar a face adaxial do limbo pilosa, flores estaminadas e pistiladas, estames e bractéolas da flor estaminada e pistilada com tamanhos menores (5.68-7.04 mm, 7.64-8.20 mm, 4.53-6.70 mm, 1.59-4.58 mm, 1.63-7.12 mm, respectivamente), sépalas das flores pistiladas com

glândulas curto-estipitadas e dentes da margem foliar com três à quatro glândulas. Ocorrendo em cerrado de altitude em Minas Gerais, Brasil, com altitude de 1.088m (Tabela 1 e 2, Fig. 2).

Importância da identificação correta das amostras. *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus* eram consideradas espécies muito semelhantes, o que muitas vezes acarretava em identificações incorretas ou equivocadas de certas amostras. Identificações taxonômicas incorretas não são desejáveis, devido às sérias implicações do ponto de vista dos resultados e conclusões de qualquer estudo científico, inclusive para fins aplicados. É preciso mencionar aqui a descoberta de três novos alcalóides sesquiterpênicos do tipo guaiano, denominados muscicapina A, B e C, isolados das raízes de amostras identificadas sob *C. muscicapa* (Araújo-Júnior et al. 2005). Entretanto, os autores indicaram um único voucher (*Agra 5995*), coletado em Caicó, no Rio Grande do Norte e depositado no herbário JPB (acrônimos segundo Thiers 2016). Como *C. muscicapa* é endêmica da Bahia, acredita-se que amostras de *C. adenocalyx* Baill. tenham sido usadas no estudo e erroneamente identificadas como *C. muscicapa*. *C. adenocalyx* ocorre nos estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (Carneiro-Torres 2009), e assim, afirmamos que a substância isolada e denominada “muscicapina”, não está de fato associada a *C. muscicapa*.

Outro bom exemplo é o estudo fitoquímico de constituintes voláteis de folhas de *Croton muscicapa* e *C. glutinosus* Müll. Arg., realizado por Gomes (2010). Nesse trabalho também foram isolados diferentes compostos das folhas de "*C. muscicapa*", relatados nessa espécie pela primeira vez. Porém, o voucher indicado que encontra-se no herbário EAC (acrônimos segundo Thiers 2016) com voucher *Silveira* (s.n) sob número de registro 38644 não se refere a *C. muscicapa*, e sim a *C. longibracteatus*, o que pode ser verificado claramente a partir do dado geográfico apresentado, sendo de Andaraí, Bahia, Brasil, além das imagens da espécie disponibilizada no trabalho. Assim, reafirmamos a grande contribuição desse

trabalho, na certificação da identidade taxonômica de *Croton muscicapa* e *C. longibracteatus*, indicação de novos táxons relacionados e esclarecimento de seus limites, a fim de evitar futuras incoerências quanto a identificação das mesmas.

Conclusão

A partir dos resultados apresentados no presente trabalho, utilizando dados morfológicos, genéticos e ecológicos, podemos inferir que *C. muscicapa* e *C. longibracteatus* são entidades taxonômicas distintas e possuem caracteres morfológicos que as definem, mas seus limites carecem de revisão. Concluimos que existem populações dentro da área de distribuição geográfica apresentada para as duas espécies que estão relacionadas às mesmas, mas que se constituem em novos táxons para o gênero *Croton*, localizados, até o momento, no estado de Minas Gerais, Brasil.

Agradecimentos

Ao Lucas Menezes pela ilustração e ao Naron Tranzilo pela elaboração dos mapas. A Capes pela bolsa de mestrado concedida a BLRB. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao PPBio Semiárido (457427/2012-4), ao Programa Flora da Bahia (483909/2012-2) e a bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a RPO (PQ1D). Ao curador do Museu Botânico Municipal (MBM), Curitiba - PR. E aos dois anônimos revisores pelas correções.

Referências

Alencar JC (1998) Identificação Botânica de árvores de floresta tropical úmida da Amazônia por meio de computador. *Acta Amazonica* 28: 3–30.

- APG VI (2016) Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20. doi: 10.1111/boj.12385
- Araújo-Júnior V.T., Silva M.S.S, da-Cunha V.L., Agra M.F., Athayde-Filho P.F., Vieira I.J.C., Braz-Filho R., Barbosa-Filho J.M. (2005) Muscicapines, a new class of guaiane-type sesquiterpene alkaloids from *Croton muscicapa*. *J. Braz. Chem. Soc* 16: 553-557. doi: 10.1590/S0103-50532005000400010
- Baack EJ, Rieseberg LH (2007) A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Curr Opin Genet Dev.* 17: 513–518. doi: 10.1016/j.gde.2007.09.001
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R (2005) Molecular Phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92: 1520-1534. doi: 10.3732/ajb.92.9.1520
- Blackstock N, Ashton PA (2010) Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s.str. (Cyperaceae) hybrid populations. *Plant Syst. Evol.* 287: 37-47. doi: 10.1007/s00606-010-0287-0
- Brammer SP (2002) Variabilidade e diversidade genética vegetal: requisito fundamental em um programa de melhoramento. EMBRAPA Trigo: Documentos Online, n.29.
- Brody JR, Kern SE (2004) Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive Medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36: 2–4.
- Burger W, Huft M (1995) Euphorbiceae. In: *Flora Costaricensi Fieldiana* II. 36:1-169.
- Carneiro-Torres DS (2009) Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Bioma Caatinga. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – BA.

- Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD (2013) How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22: 4369 – 4383. doi: 10.1111/mec.12413
- Colombo C, Second G, Valle TL, Charrier A (1998) Genetic diversity characterization of cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 21: 105-113.
- Conesa MA, Mus M, Rosselló JA (2012) Leaf shape variation and taxonomic boundaries in two sympatric rupicolous species of *Helichrysum* (Asteraceae: Gnaphalieae), assessed by linear measurements and geometric morphometry. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 498-513. doi: 10.1111/j.1095-8312.2012.01889.x
- Cordeiro I, Secco R, Cardiel JM, Steinmann V, Caruzo MBR, Riina R, Lima LR de, Maya-L CA, Berry P, Carneiro-Torres DS, Silva OLM, Sales MFD, Silva MJ da, Sodr e RC, Martins MLL, Pscheidt AC, Athi -Souza SM, Melo ALD, Oliveira LSD, Paula-Souza J, Silva RAP (2015) Euphorbiaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: [//http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113](http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113) Acesso em 14 Nov. 2016.
- Crompton CW, Stahevitch AE, Wojtas WA (1990) Morphometrics studies of the *Euphorbia esula* group in North America. *Canadian Journal of Botany* 68:1978-1988. doi: 10.1139/b90-260
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Duminil J, Di Michele M (2009) Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* 1–15. doi: 10.1080/11263500902722964
- Egan NA (2015) Species delimitation and recognition in the *Pediomelum megalanthum* complex (Fabaceae) via multivariate morphometrics. *PhytoKeys* 44: 65–87. doi: 10.3897/phytokeys.44.8750

- Estopa RA, Souza AM, Moura MCO, Botrel MCG, Mendonça EV, Carvalho D (2006) Diversidade genética em populações naturais de Candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). *Scientia Forestalis* 70: 97-106.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Faleiro FG (2007) Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados. 102p.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources* 7: 574-578. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Felsenstein J (2011) Phylip: phylogeny inference package version 3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. available from <http://evolution.Genetics.Washington.edu/phylip.html>.
- Fernandes, RC (2008) Diversidade e estrutura genética em populações naturais de Pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no norte de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- Ge XJ, Sun M (2001) Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. *Wetlands Ecology and Management* 9: 203-209. doi: 10.1023/A:1011156707160
- Gomes L.C. (2010) Estudo químico de *Croton muscicarpa* e *Croton glutinosus* Müll. Arg (Euphorbiaceae). Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE.

- Grupta S, Srivastava M, Mishra GP, Naik PK, Chauhan RS, Tiwari SK, Kumar M, Singh R (2008) Analogy of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different *Jatropha curcas* genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7: 4230–4243.
- Hausdorf B, Hennig C (2010) Species Delimitation Using Dominant and Codominant Multilocus Markers. *Syst. Biol.* 59: 491–503. doi: 10.1093/sysbio/syq039
- Henderson A (2006) Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 103-111. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00526.x
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Kolawole OS, Abdulrahman AA, Jimoh MA, Oladele FA (2016) Morphometric study of several species of the genus *Jatropha* Liin. (Euphorbiaceae). *Not Sci Biol* 8: 211-215. doi: 10.15835/nsb.8.2.9768
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.
- Lima LR de, Pirani JR (2003) O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 299-344. doi: 10.11606/issn.2316-9052.v21i2p299-344
- Lima LR de, Pirani JR (2008) Revisão taxonômica de *Croton* sect. *Lamprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). *Biota Neotrop.* 8: 177-231.
- Lira Neto AC (2011) Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasileiro. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

- Lucena MFA (2009) Diversidade de Euphorbiaceae (s.l) no Nordeste do Brasil. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Recife – PE.
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature* 446: 279-283. doi: 10.1038/nature05706
- Martínez Gordillo M, de Luna E (2005) Espécie nueva de *Croton* (Euphorbiaceae) de Brasil. *Novon* 15: 568-571.
- Martínez Gordillo M, Matías SE (2005) Tricomas foliares de *Croton* Sección Barhamia (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Mexicana* 72: 39-51.
- Mori SA, Silva LAM, Lisboa G, Coradin (1989) Manual de Manejo do Herbário Fanerogâmico. 2ed. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia.
- Müller Argoviensis J (1873) *Croton muscicapa*. *Flora Brasiliensis*. v.11, Part II, Fasc. 61, p. 199-200.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics* 89: 583-590.
- Nybom H (2004) Comparason of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02141.x
- Ocelák M, Hlásná Cepková P, Viehmannová I, Dvoraková Z, Huansi DC (2015) Genetic diversity of *Plukenetia Volubilis* L. assessed by ISSR markers. *Scientia Agriculturae Bohemica* 46 (4): 145–153.
- Oliveira TG, Pereira AMS, Copped JS, França SC, Ming LC, Bertoni BW (2015) Genetic diversity analysis of *Croton antisiphiliticus* Mart. Using AFLP molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 15: 1–8. doi: 10.4238/gmr.15017461

- Palmquist E, Ayers T, Allan G (2015) Genetic and Morphometric Assessment of the Origin, Population Structure, and Taxonomic Status of *Anticlea vaginata* (Melanthiaceae). *Systematic Botany* 40: 56–68. doi: 10.1600/036364415X686332
- Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Piedra-Malagón EV, Sosa V, Ibarra-Manríquez G (2011) Clinal variation and species boundaries in the *Ficus petiolaris* complex (Moraceae). *Systematic Botany* 36: 80–87.
- Pires MMY, Souza LAS, Terada Y (2004) Biologia floral de *Croton urucana* Baill. (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação ripária da ilha Porto Rico, Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 26: 209-215. doi: 10.4025/actascibiolsoci.v26i2.1638
- Printchard JK, Sterhens P, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rambaut A (2009) Tree Figure Drawing Tool, version 1.3.1. Edinburgh: Institute of Evolutionary Biology.
- Riina R, Berry PE, van Ee BW (2009) Molecular Phylogenetics of the Dragon's Blood *Croton* Section *Cyclostigma* (Euphorbiaceae): A Polyphyletic Assemblage Unraveled. *Systematic Botany* 34: 360–374. doi: 10.1600/036364409788606415
- Riesenberg LH, Willis JH (2007) Plant Speciation. *Science* 317: 910-914. doi: 10.1126/science.1137729
- Ritland, K (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetic Research* 67: 175-185. doi: 10.1017/S0016672300033620
- Rocha T de O, Freitas JS, Santos ESL dos, Scaldeferri MM, Oliveira CG de, Cerqueira-Silva CBM (2016) Estimate of genetic diversity in cassutinga (*Croton heliotropifolius*) based

- on molecular markers. *African Journal of Biotechnology* 15: 518-523. doi: 10.5897/AJB2015.15009
- Rodríguez A, Corazon-Guivin M, Cachique D, Mejía K, Castillo DD, Renno J-F, García-Dávila C (2010) Diferenciación morfológica y por ISSR (Inter simple sequence repeats) de especies del género *Plukenetia* (Euphorbiaceae) de la Amazonía peruana: propuesta de una nueva especie. *Rev. Peru. Biol.* 17: 325-330.
- Rohlf FJ (1990) Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21: 299-316
- Roth VL, Mercer JM (2000) Morphometrics in Development and Evolution. *Amer. Zool.* 40: 801-810. doi: 10.1668/0003-1569(2000)040[0801:MIDAE]2.0.CO;2
- Safaei M, Sheidai M, Alijanpoor B, Noormohammadi Z (2016) Species delimitation and genetic diversity analysis in *Salvia* with the use of ISSR molecular markers. *Acta Bot. Croat.* 75: 45–52. doi: 10.1515/botcro-2016-0005
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Salman AKD (2007) Conceitos básicos de genética de populações. EMBRAPA: Documentos. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia. 27p.
- Secco R de S, Berry PE (2013) Novidades sobre a morfologia floral e distribuição geográfica de *Croton pycnadenius* Müll. Arg. (Euphorbiaceae s.s.). *R. bras. Bioc.* 11: 297-300.
- Secco R de S, Cordeiro I, Fernandez EP, Monteiro NP, Messina T, Borges RAXB, Santos Filho LAF (2013) Euphorbiaceae. In: Martinelli G, Moraes MA (Orgs.). Livro Vermelho da Flora do Brasil. Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 509-515.
- Silva JRS (2008) Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van den Berg (Orchidaceae). Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. *Ecological genetics* 3-17.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*, Freeman and Co, California.
- Sodré RC, Silva M J da, Sales MF de (2014) *Croton* L. (Euphorbiaceae) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia* 65: 221-234.
- Soladoye MO, Sonibare MA, Rosanwo TO (2008) Phytochemical and morphometric analysis of the genus *Acalypha* Linn. (Euphorbiaceae). *Journal of Applied Sciences* 8: 3044-3049. doi: 10.3923/jas.2008.3044.3049
- Statsoft INC (2010) *STATISTICA for Windows*, version 10.0 (computer program manual), Statsoft, Oklahoma.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-203.
- Thiers, B. (2016+) *Index Herbariorum: a global directory of public 22 herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>, Acesso 15 Janeiro 2016
- Turelli M, Barton NH, Coyne JA (2001) Theory and speciation. *TRENDS in Ecology e Evolution* 16: 330–343. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02177-2
- Van Ee BW, Riina R, Berry PE (2011) A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60: 791–823.
- Vekemans X (2002) *AFLP-surv version 1.0*. Belgium: Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles.
- Webster GL (1993) A provisional synopsis of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793-823.
- Webster GL (1994) Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 1-144.

Wolfe AD, Xiang Qiu-Yun, Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.

Wurdack KJ, Davis CC (2009) Malpighiales phylogenetics: gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96: 1551-1570. doi: 10.3732/ajb.0800207

Tabela 1. Identificação das populações analisadas com suas respectivas localidades, coordenadas geográficas, número de indivíduos, informações sobre vegetação e altitude utilizados na análise morfométrica e genética, e voucher que foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS).

População	Município/Localidade	Localização Geográfica	Nº de indivíduos	Vegetação	Altitude	Voucher
CAM1	Jacobina (BA), Subida para a Serra do Brito	11°10'775'' S 40°29'911'' W	15	Floresta estacional, antropizada.	600m	BARBOSA, B.L.R. et al. 01;
CM1	Jacobina (BA), Cachoeira Véu de Noiva	11°19'944'' S 40°30'198'' W	15	Floresta estacional	650m	BARBOSA, B.L.R. et al. 04
CM2	Pindobaçu (BA), Trilha para a Serra da Fumaça	10°40'080'' S 40°21'724'' W	15	Floresta estacional	593m	BARBOSA, B.L.R. et al. 08
CM3	Palmeiras (BA), Serra Negra	12° 35'57'' S 41°36'12'' W	15	Caatinga	740m	BARBOSA, B.L.R. et al. 16
CAM2	Grão Mogol (MG), Início da Trilha do Barão	16° 33'24.8''S 42° 53' 27.6'' W	13	Campo Rupestre	873m	BARBOSA, B.L.R. et al. 17
CL1	Mucugê (BA), Cemitério Bizantino	13°00'406'' S 41°22'598'' W	15	Campo rupestre (antropizado)	967m	BARBOSA, B.L.R. et al.11
CL2	Mucugê (BA), Trilha para o Vale do Medonho	13°05'21'' S 41°22'41'' W	15	Campo rupestre	1.021m	BARBOSA, B.L.R. et al. 12
CL3	Igatú – Andaraí (BA) Estrada de Mucugê para Igatú	13°01'43'' S 41°21'30'' W	15	Campo Rupestre	780m	BARBOSA, B.L.R. et al. 13
CL4	Lençóis (BA), Em frente ao Rio Mucugêzinho	12°27'52'' S 41°25'45'' W	15	Campo Rupestre	797m	BARBOSA, B.L.R. et al. 14
CL5	Lençóis (BA), Trilha para a Pedra Verde		15	Campos Gerais	800m	BARBOSA, B.L.R. et al. 15
CAL	Jequitinhonha (MG)	16° 20' 11.2'' S 41° 5' 25.4'' W	15	Cerrado de altitude	1.088m	BARBOSA, B.L.R. et al. 19

Tabela 2. (Continuidade)

Caracteres morfológicos	CAM1	CM1, CM2, CM3	CAM2	CL1, CL2, CL3, CL4, CL5	CAL
22- Quantidade de glândulas na bractéola da flor pistilada	7.36 ± 1.65 ^a (4.00 – 10.00)	5.86 ± 2.32 ^a (3.00 – 13.00)	6.52 ± 1.00 ^a (4.99 – 8.07)	12.38 ± 5.01 ^b (4.00 – 26.00)	12.64 ± 3.03 ^b (8.00 – 18.00)
Flor Estaminada					
23- Comprimento da flor estaminada	5.68 ± 0.88 ^{bc} (4.02 – 6.84)	5.48 ± 0.48 ^b (4.70 – 6.65)	3.93 ± 0.28 ^a (3.44 – 4.47)	8.65 ± 0.97 ^d (6.09 – 11.09)	6.16 ± 0.39 ^c (5.68 – 7.04)
24- Comprimento do pedicelo	3.78 ± 0.54 ^b (2.72 – 4.87)	3.72 ± 1.01 ^b (1.85 – 5.94)	1.59 ± 0.41 ^a (0.84 – 2.43)	3.79 ± 1.07 ^b (1.13 – 6.83)	3.09 ± 0.87 ^b (1.86 – 4.89)
25- Comprimento da sépala	4.09 ± 0.50 ^{cd} (3.11 – 4.88)	3.69 ± 0.36 ^{bc} (2.66 – 4.67)	3.25 ± 0.34 ^a (2.78 – 3.87)	4.44 ± 0.51 ^d (3.28 – 5.67)	3.51 ± 0.39 ^{ab} (2.59 – 4.14)
26- Largura da sépala (1/2)	2.28 ± 0.31 ^b (1.66 – 2.91)	1.79 ± 0.19 ^a (1.21 – 2.20)	1.80 ± 0.29 ^a (1.42 – 2.49)	2.28 ± 0.34 ^b (1.45 – 3.61)	1.87 ± 0.22 ^a (1.61 – 2.48)
27- Comprimento da pétala	4.51 ± 0.49 ^c (3.62 – 5.47)	3.93 ± 0.38 ^b (2.88 – 4.77)	2.98 ± 0.43 ^a (2.02 – 3.54)	4.40 ± 0.60 ^c (2.16 – 6.14)	3.68 ± 0.34 ^b (2.94 – 4.03)
28- Largura da pétala (1/2)	2.91 ± 0.38 ^b (2.32 – 3.94)	2.83 ± 0.41 ^b (1.86 – 3.72)	2.32 ± 0.22 ^a (1.96 – 2.73)	2.64 ± 0.46 ^{ab} (1.31 – 3.85)	2.45 ± 0.24 ^a (1.97 – 2.98)
29- Número de estames	11.00 ± 0.00 ^a (11.00 – 11.00)	11.12 ± 0.28 ^a (11.00 – 12.00)	14.66 ± 1.58 ^b (15.00 – 17.00)	11.20 ± 0.37 ^a (11.00 – 12.00)	11.21 ± 0.40 ^a (11.00 – 12.00)
30- Comprimento do maior estame	4.99 ± 0.64 ^b (3.70 – 6.08)	4.79 ± 0.58 ^b (3.43 – 6.24)	3.41 ± 0.35 ^a (2.84 – 3.99)	7.85 ± 1.14 ^c (5.77 – 11.52)	5.51 ± 0.56 ^b (4.53 – 6.70)
Flor Pistilada					
31- Comprimento da flor pistilada	8.72 ± 0.79 ^c (7.45 – 10.10)	7.11 ± 0.81 ^b (5.17 – 8.74)	4.82 ± 0.77 ^a (3.58 – 6.22)	12.46 ± 1.58 ^d (8.89 – 17.71)	8.09 ± 0.16 ^{bc} (7.64 – 8.20)
32- Comprimento do pedicelo	5.86 ± 0.99 ^b (3.92 – 7.60)	8.64 ± 2.33 ^c (2.85 – 12.16)	4.37 ± 1.91 ^a (1.53 – 8.42)	3.45 ± 0.90 ^a (0.86 – 5.90)	3.55 ± 0.37 ^a (2.91 – 4.62)
33- Comprimento da sépala	8.81 ± 0.85 ^c (7.71 – 10.57)	6.85 ± 0.99 ^b (4.42 – 8.95)	3.75 ± 0.50 ^a (2.78 – 4.60)	12.08 ± 1.47 ^d (9.63 – 17.90)	7.75 ± 0.75 ^b (6.40 – 9.06)
34- Largura da sépala (1/2)	1.84 ± 0.24 ^{bc} (1.40 – 2.33)	1.64 ± 0.45 ^{bc} (0.99 – 2.39)	1.17 ± 0.41 ^a (0.70 – 2.10)	2.02 ± 0.50 ^c (0.84 – 3.32)	1.63 ± 0.27 ^b (1.15 – 2.20)
35- Quantidade de glândulas na sépala	18.70 ± 4.08 ^b (12.00 – 25.00)	12.81 ± 4.96 ^{ab} (8.00 – 32.00)	8.13 ± 2.26 ^a (4.23 – 13.00)	47.18 ± 9.81 ^c (24.00 – 86.00)	63.37 ± 10.73 ^d (45.00 – 87.00)
36- Número de estigmas	13.03 ± 1.29 ^b (10.00 – 15.00)	9.83 ± 0.94 ^a (9.00 – 12.00)	9.25 ± 0.25 ^a (9.00 – 10.00)	9.06 ± 1.01 ^a (6.00 – 13.00)	9.25 ± 0.62 ^a (8.00 – 11.00)
37- Comprimento do maior estilete	3.91 ± 0.25 ^b (3.61 – 4.45)	3.93 ± 0.69 ^b (2.19 – 5.65)	2.81 ± 0.52 ^a (2.08 – 3.85)	6.54 ± 1.14 ^c (3.65 – 8.81)	3.68 ± 0.61 ^b (2.38 – 4.91)

Tabela 3. Relação dos oito primers de ISSR (Wolf 1998) selecionados para o estudo e suas respectivas seqüências iniciadoras.

Primer	Seqüência iniciadora
UBC 843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA
UBC 844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
BECKY	CAC ACA CAC ACA CAY C
JHON	AGA GAG AGA GAG AGY C
MAO	CTC CTC CTC CTC RC
MANNY	CAC CAC CAC CAC RC
ISSR 6	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
TERRY	GTG GTG GTG GGT GRC

Tabela 4. Classificação de indivíduos na análise de discriminante de 10 caracteres vegetativos nas 11 populações estudadas. Na Tabela 1 encontram-se os nomes das populações.

	Porcentagem correta	CAM1	CM1	CM2	CM3	CAM2	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CAL
CAM1	86,66666	13	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-
CM1	73,33334	-	11	2	1	1	-	-	-	-	-	-
CM2	86,66666	-	-	13	1	1	-	-	-	-	-	-
CM3	73,33334	-	-	1	11	3	-	-	-	-	-	-
CAM2	53,84615	-	2	2	2	7	-	-	-	-	-	-
CL1	60,00000	-	-	-	-	-	9	1	1	2	2	-
CL2	60,00000	-	-	-	-	-	2	9	-	1	3	-
CL3	80,00000	-	-	-	-	-	1	2	12	-	-	-
CL4	40,00000	-	1	-	-	-	3	4	-	6	-	1
CL5	53,33333	-	-	-	-	-	2	3	1	1	8	-
CAL	80,00000	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	12
Total	68,09816	14	14	21	15	12	17	19	14	10	14	13

Tabela 5. Classificação de indivíduos na análise discriminante de 37 caracteres morfológicos (vegetativos e reprodutivos) em 11 populações analisadas. Na Tabela 1 encontram-se os nomes das populações.

	Porcentagem correta	CAM1	CM1	CM2	CM3	CAM2	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CAL
CAM1	100,0000	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM1	100,0000	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM2	100,0000	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-
CM3	93,3333	-	-	1	14	-	-	-	-	-	-	-
CAM2	100,0000	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-
CL1	100,0000	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
CL2	100,0000	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-
CL3	100,0000	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-
CL4	100,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	15	-	-
CL5	93,3333	-	-	-	-	-	1	-	-	-	14	-
CAL	100,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Total	98,7730	15	15	16	14	13	16	15	15	15	14	15

Tabela 6. Correlações entre as variáveis e os três primeiros eixos canônicos discriminantes da CVA para as 11 populações. Os nomes das variáveis estão na Tabela 2.

Variável	Todos os caracteres			Caracteres vegetativos		
	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 1	Eixo 2	Eixo3
V1	0,372	-0,281	0,156	-0,578	0,157	1,791
V2	-0,073	-0,124	-0,298	0,177	0,571	-0,191
V3	0,556	0,567	-0,544	-0,421	0,403	1,230
V4	-0,522	0,669	0,347	1,023	-0,371	-1,676
V5	0,108	0,107	0,105	0,479	0,170	0,413
V6	-0,012	-0,607	0,100	-0,185	-0,114	-0,316
V7	-0,028	-0,314	0,270	-0,013	-0,926	0,147
V8	-0,014	-0,038	-0,333	0,180	0,540	0,158
V9	-0,124	-0,057	0,035	-0,671	-0,072	-0,480
V10	-0,340	0,138	0,060	-0,192	0,261	-0,355
V11	-0,058	0,311	0,292			
V12	-0,065	0,040	0,240			
V13	-0,084	-0,041	0,376			
V14	-0,073	0,059	-0,093			
V15	-0,113	0,203	-0,516			
V16	-0,096	0,039	0,081			
V17	-0,103	0,195	-0,455			
V18	-0,255	-0,333	-0,127			
V19	0,648	0,323	-0,113			
V20	-0,409	-0,181	-0,008			
V21	-0,124	-0,153	0,235			
V22	-0,057	0,213	-0,212			
V23	-0,452	-0,072	0,010			
V24	0,049	-0,347	0,091			
V25	0,416	0,020	0,018			
V26	-0,139	0,014	-0,207			
V27	-0,091	-0,116	-0,309			
V28	0,374	-0,052	0,103			
V29	0,170	0,584	0,237			
V30	-0,165	-0,104	0,189			
V31	-0,011	0,521	-0,002			
V32	0,585	-0,558	0,120			
V33	-0,324	-0,713	-0,185			
V34	-0,269	-0,124	-0,287			
V35	-0,202	0,607	0,154			
V36	0,088	-0,068	-0,568			
V37	-0,329	-0,260	0,111			

Tabela 7. Parâmetros de variabilidade genética das 11 populações presentes nesse trabalho. **A** (Número de bandas), **%P** (Loci polimórficos), **He** (Heterozigosidade média esperada); **I** (Índice de Shannon). Identificação das populações na Tabela 1.

População	A	%P	He	I	Loci exclusivos
CAM1	87	68,10%	0,206	0,318	0
CM1	83	61,21%	0,188	0,289	0
CM2	66	44,83%	0,113	0,182	0
CM3	88	53,45%	0,146	0,230	0
CAM2	50	30,17%	0,088	0,137	0
CL1	87	70,69%	0,223	0,343	0
CL2	70	50,86%	0,151	0,235	0
CL3	80	61,21%	0,176	0,275	0
CL4	77	61,21%	0,180	0,280	0
CL5	79	60,34%	0,187	0,288	0
CAL	72	50,86%	0,154	0,237	0
Média		55,72%	0,165	0,256	0

Tabela 8. Identidade Genética de Nei (Nei Unbiased Genetic Identity – Nei 1978) estimada com base nos padrões de ISSR entre as populações analisadas. Para os códigos das populações, ver Tabela 1.

Populações	CAM1	CM1	CM2	CM3	CAM2	CL1	CL2	CL3	CL4	CL5	CAL
CAM1	1,000										
CM1	0,918	1,000									
CM2	0,900	0,950	1,000								
CM3	0,752	0,720	0,723	1,000							
CAM2	0,817	0,778	0,811	0,733	1,000						
CL1	0,863	0,818	0,833	0,726	0,781	1,000					
CL2	0,831	0,761	0,798	0,719	0,788	0,944	1,000				
CL3	0,853	0,807	0,825	0,740	0,801	0,917	0,942	1,000			
CL4	0,832	0,774	0,777	0,706	0,758	0,914	0,916	0,899	1,000		
CL5	0,833	0,779	0,776	0,712	0,746	0,926	0,927	0,915	0,956	1,000	
CAL	0,800	0,771	0,800	0,737	0,816	0,889	0,877	0,860	0,848	0,845	1,000

Tabela 9. Resumo da análise Molecular de Variância (AMOVA) das populações analisadas, a partir de dados de ISSR. Para os códigos das populações, ver Tabela 1.

	Df	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual de variação
Variância entre populações	10	1298.856	129,886	41%
Variância dentro das populações	152	1775.800	11,683	59%
Total	162	3074.656	-	100%

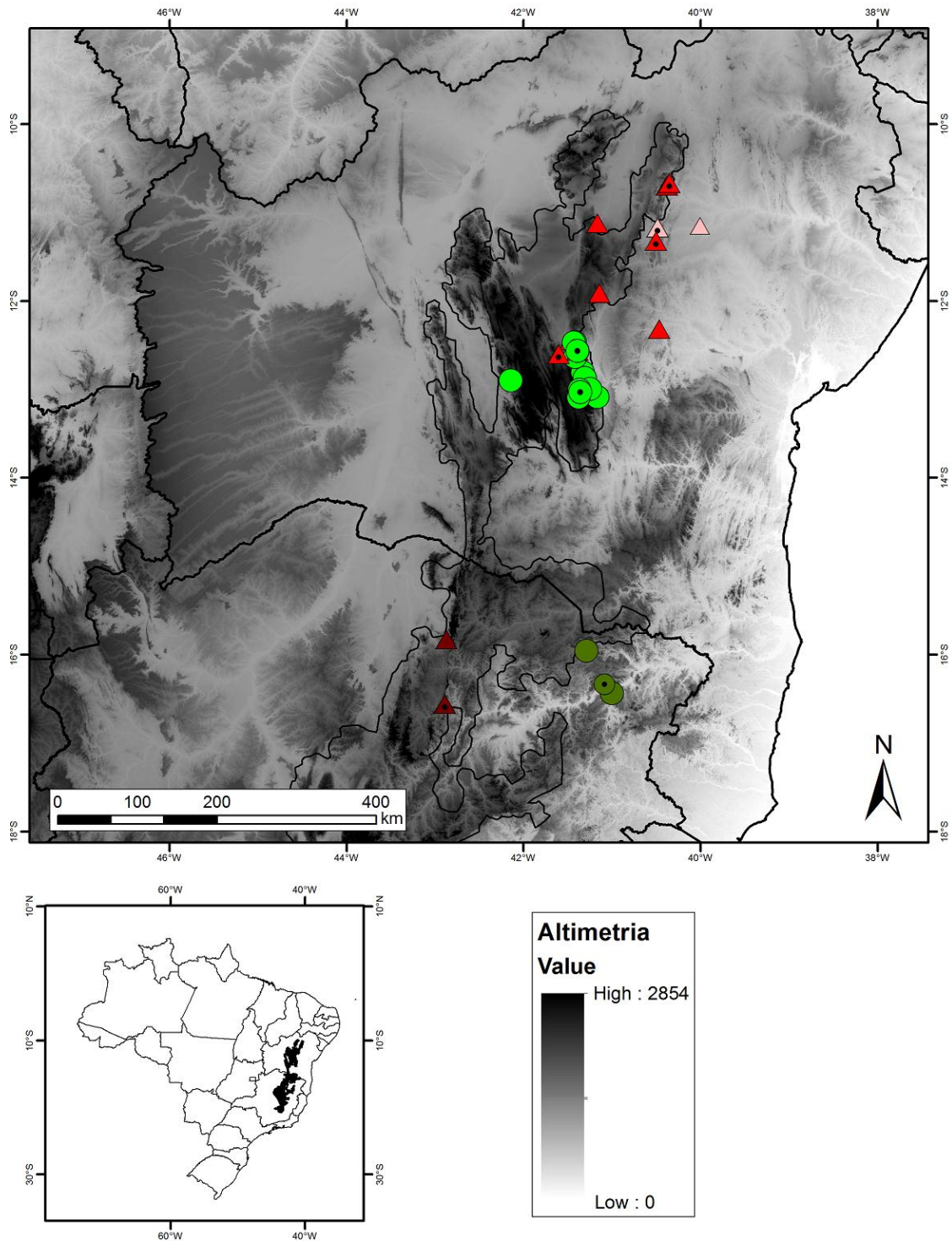


Figura 1. Distribuição geográfica de *C. longibracteatus* (○) e *C. muscicapa* (Δ). Pontos dentro dos símbolos são áreas coletadas. *C. muscicapa* (CM1, CM2, CM3) em vermelho; morfotipo CAM1 rosa; morfotipo CAM2 vermelho escuro; *C. longibracteatus* (CL1, CL2, CL3, CL4, CL5) verde claro; e morfotipo CAL verde escuro.



Figura 2. Populações de espécies de *Croton* analisadas. **A–C:** *C. muscicapa*. **A.** Inflorescência com botões estaminados e flor pistilada; **B.** Flores pistiladas; **C.** Inflorescência com botões e flores estaminadas. **D–F** População CAM1. **D.** Hábito; **E.** Inflorescência com flor pistilada; **F.** Inflorescência com botões e flores estaminadas; **G–H** População CAM2. **G.** Inflorescência com flores estaminadas; **H.** Inflorescência com flores pistiladas; **I–K** *C. longibracteatus*. **I.** Hábito; **J.** Inflorescência com botões estaminados e flor pistilada; **K.** Inflorescência com flores pistiladas, e flores e botões estaminados; **L–O:** População CAL. **L.** Hábito; **M.** Inflorescência com flores pistiladas e flor estaminada; **N.** Flor pistilada; **O.** Inflorescência com flores estaminadas. Fotos: D.S. Carneiro-Torres e B.L.R. Barbosa.

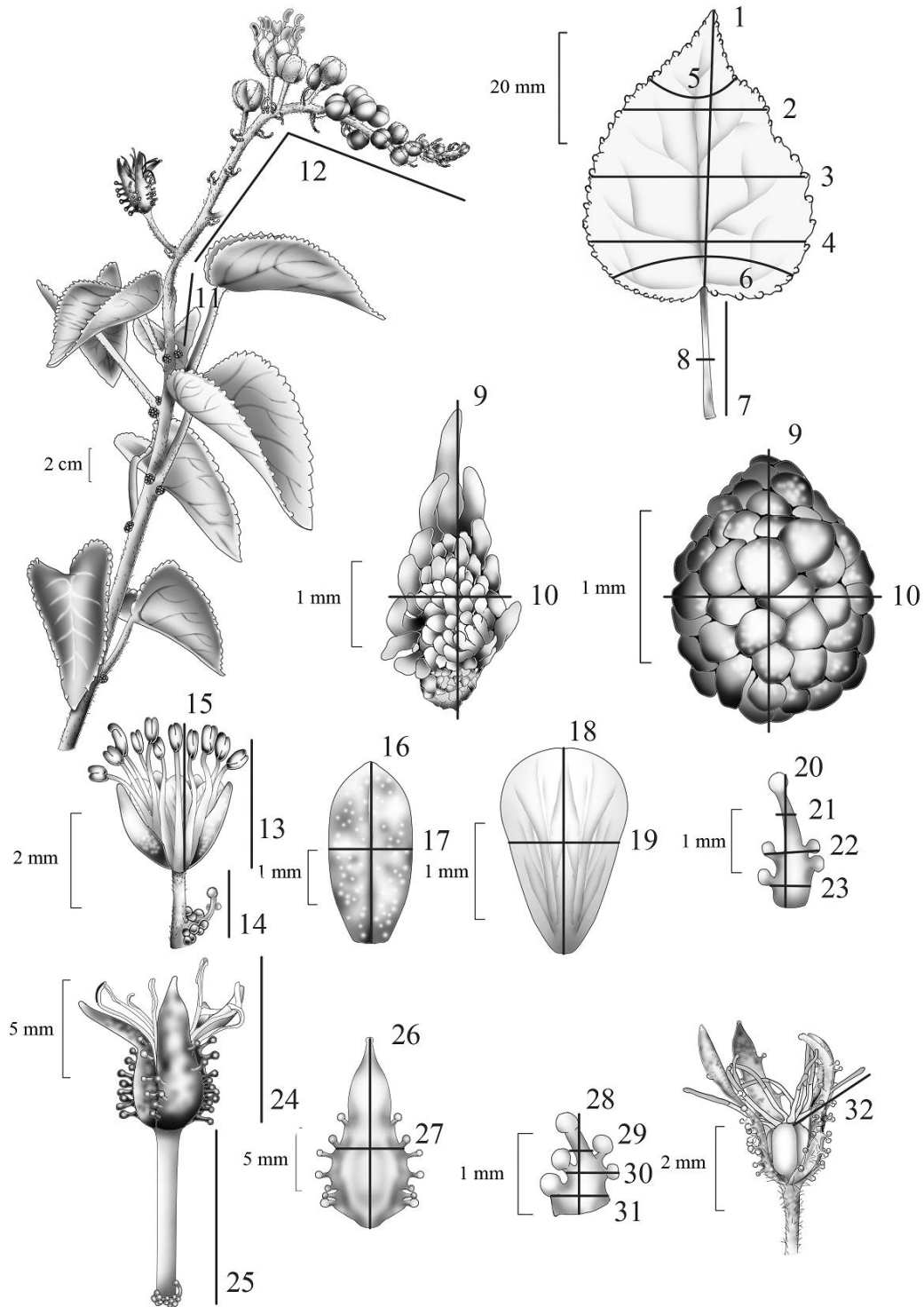


Figura 3. Caracteres utilizados na avaliação morfométrica entre as espécies de *Croton* analisadas. **1-10: Folha** 1. Comprimento; 2. Largura $\frac{1}{4}$; 3. Largura $\frac{1}{2}$; 4. Largura $\frac{3}{4}$; 5. Ângulo do ápice; 6. Ângulo da base; 7. Comprimento do pecíolo; 8. Largura do pecíolo; 9. Comprimento da estípula; 10. Largura da estípula. **11-12 Inflorescência** 11. Comprimento do pedúnculo; 12. Comprimento da inflorescência. **13-23 Flor estaminada** 13. Comprimento da flor; 14. Comprimento do pedicelo; 15. Comprimento do maior estame; 16. Comprimento da sépala; 17. Largura da sépala; 18. Comprimento da pétala; 19. Largura da pétala; 20. Comprimento da bractéola; 21. Largura $\frac{1}{4}$ da bractéola; 22. Largura $\frac{1}{2}$ da bractéola; 23. Largura $\frac{3}{4}$ da bractéola. **24-32 Flor pistilada** 24. Comprimento da flor; 25. Comprimento do pedicelo; 26. Comprimento da sépala; 27. Largura de sépala; 28. Comprimento da bractéola; 29. Largura $\frac{1}{4}$ da bractéola; 30. Largura $\frac{1}{2}$ da bractéola; 31. Largura $\frac{3}{4}$ da bractéola; 32. Comprimento do maior estilete.

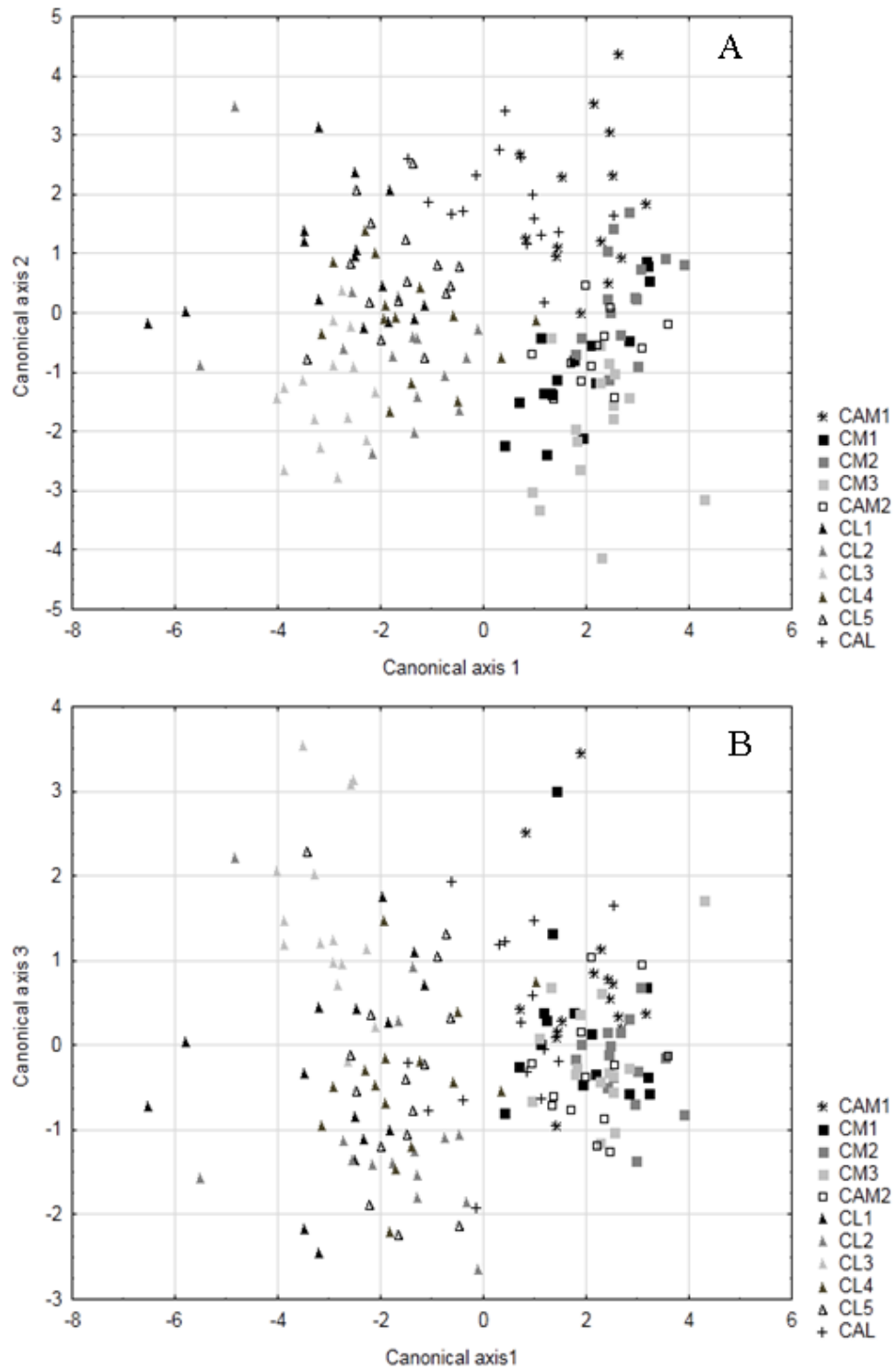


Figura 4. Representação dos escores dos três primeiros eixos da CVA usando 10 caracteres vegetativos em 11 populações de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*. **A.** Eixo canônico 1 e 2; **B.** Eixo canônico 1 e 3. Os nomes das populações encontram-se da Tabela 1.

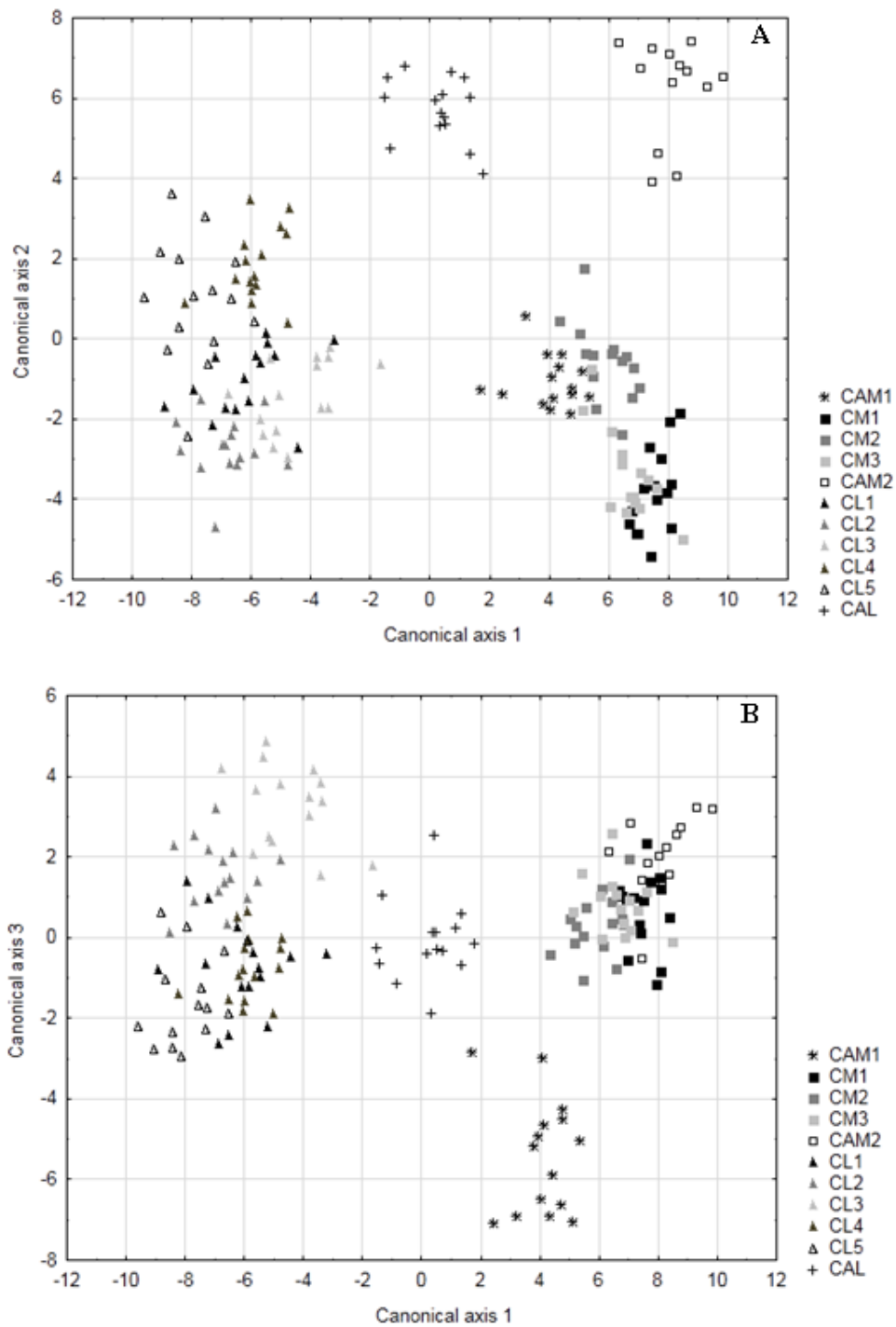


Figura 5. Representação dos escores dos três primeiros eixos da CVA usando 37 caracteres morfológicos em 11 populações estudadas. **A.** Eixo canônico 1 e 2; **B.** Eixo canônico 1 e 3. Os nomes das populações encontram-se da Tabela 1.

Mahalanobis Generalized Distance/UPGMA

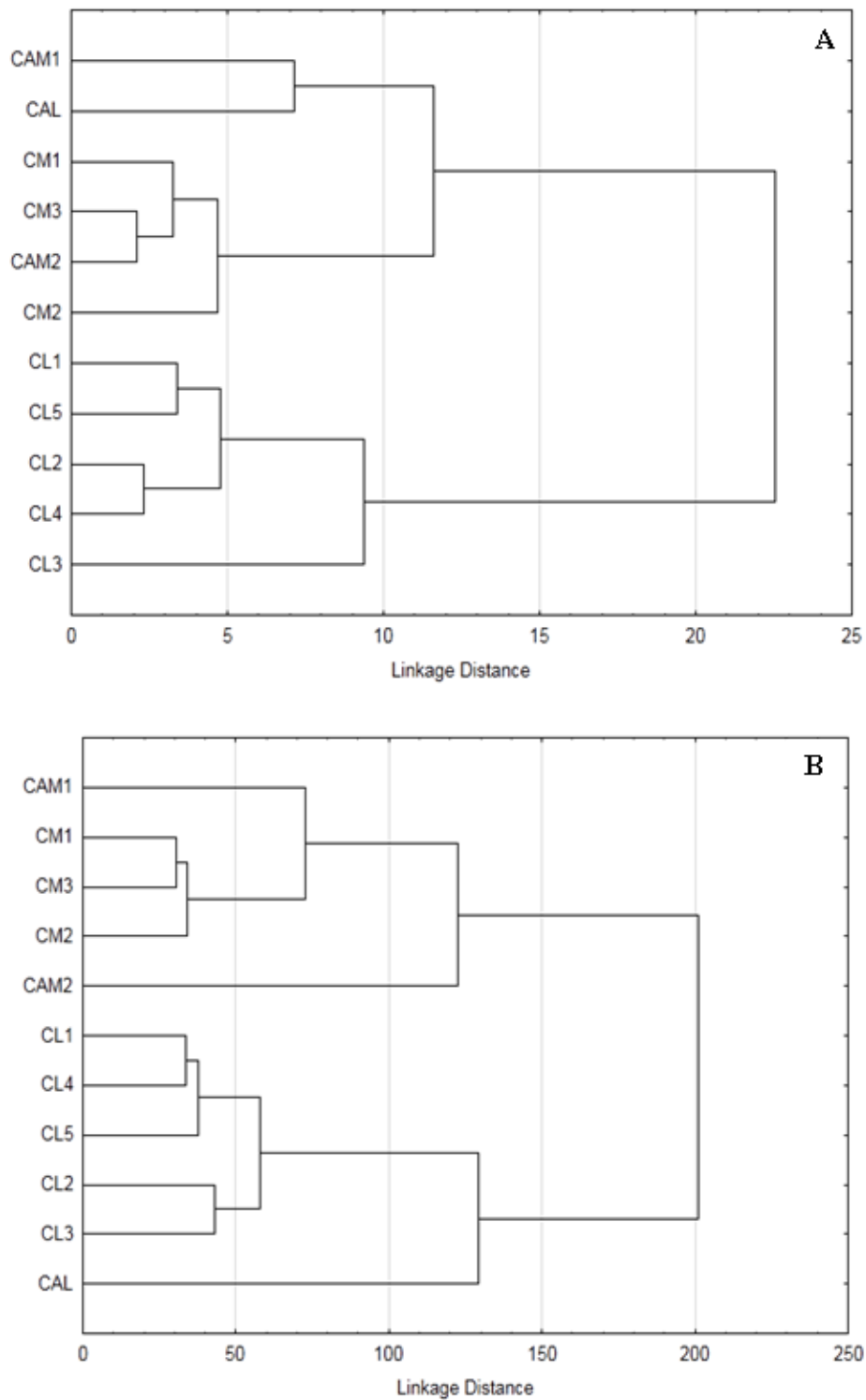


Figura 6. Dendrograma apresentando as relações fenéticas entre as populações analisadas, construído usando a matriz de Distância Generalizada de Mahalanobis com algoritmo de agrupamento UPGMA. Baseado em: **A.** 10 caracteres vegetativos para as 11 populações. **B.** 37 caracteres morfológicos vegetativos e reprodutivos para 11 populações; Os nomes das populações encontram-se na Tabela 1.

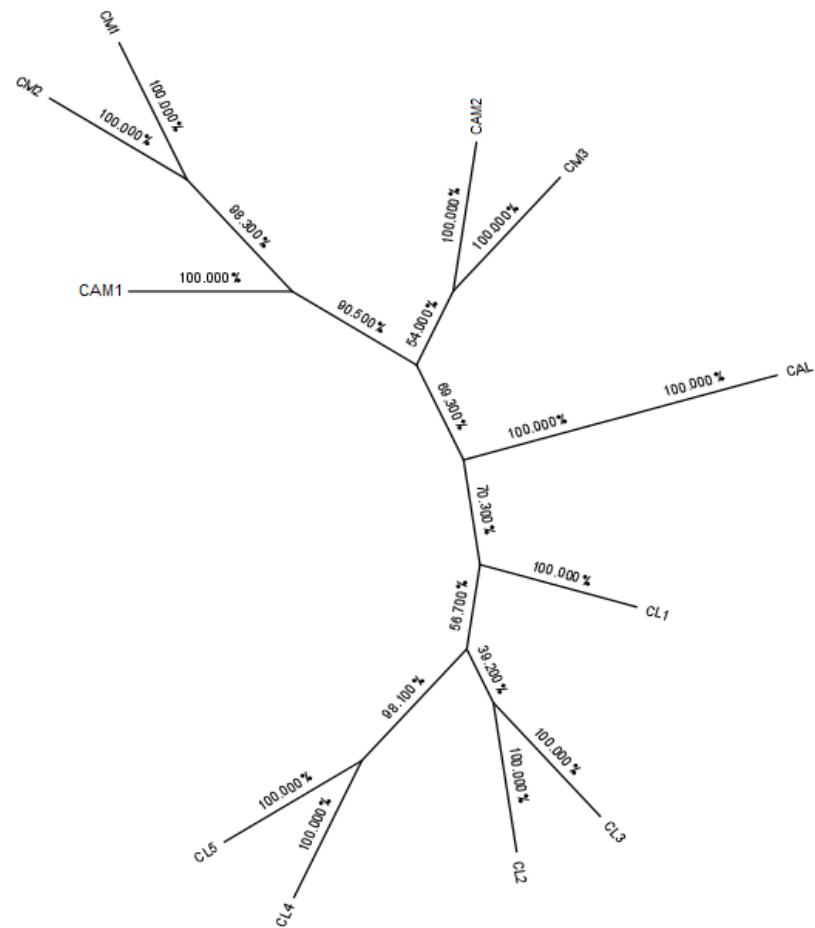


Figura 7. Análise de agrupamento das populações a partir dos dados genéticos, através da distância genética de Nei obtida a partir de ISSR, utilizando o método de Neighbor-Joining. Para os códigos das populações, ver Tabela 1.

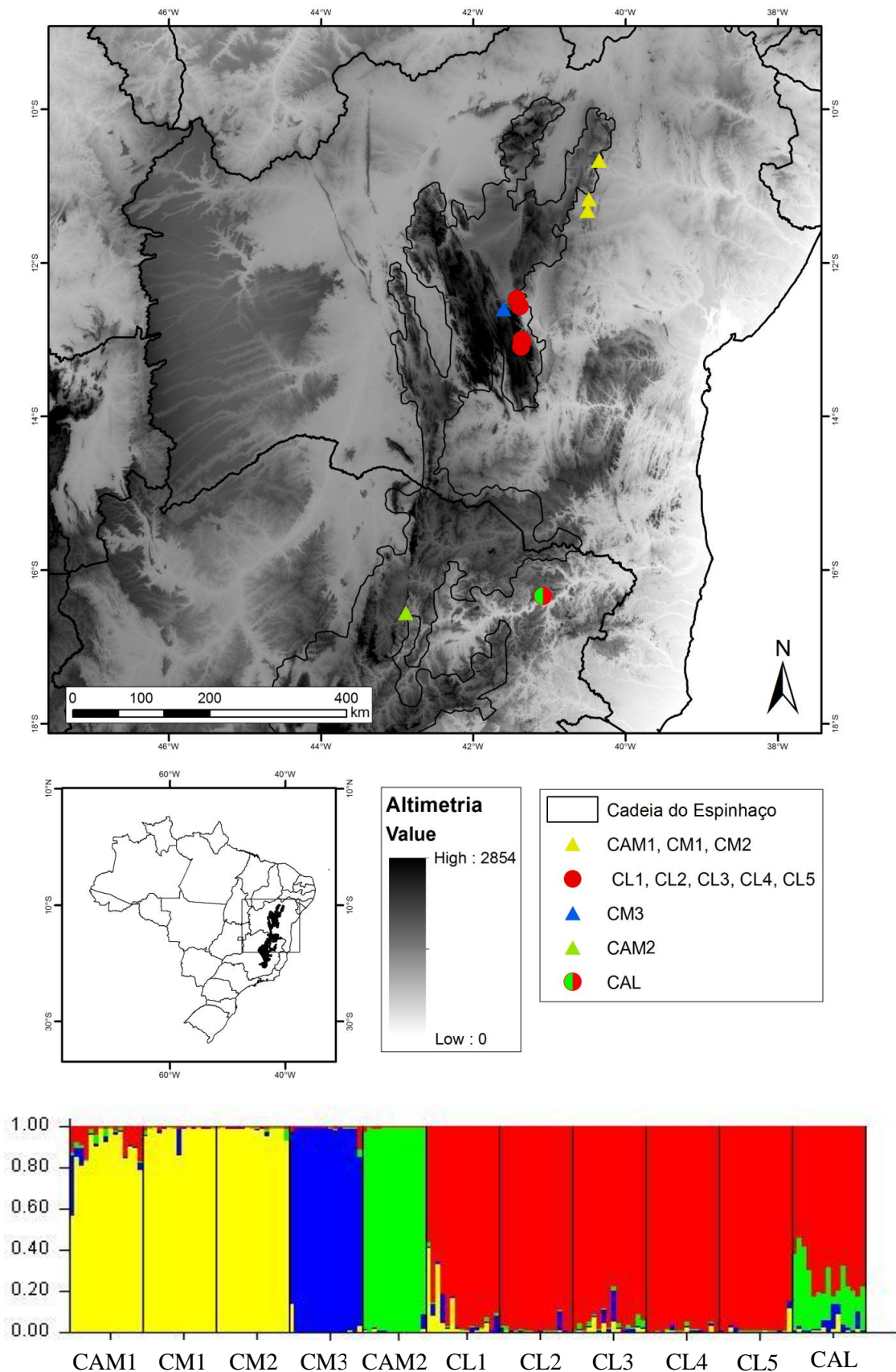


Figura 8. Mapa indicando a área de coleta, nos estados da Bahia e Minas Gerais, e estruturação genética das 11 populações analisadas no trabalho. As cores nas localizações de coletas do mapa estão relacionadas ao gráfico de estruturação gerado a partir de dados moleculares de ISSR com o Software STRUCTURE indicando o valor de $\Delta K=4$.

Capítulo 2

Croton aemulus and *C. graomogolensis*

**(Euphorbiaceae): two new species from Minas Gerais,
Brazil, based on distinct lines of evidence and their
relation with *C. muscicapa* and *C. longibracteatus***

Croton aemulus* and *C. graomogolensis* (Euphorbiaceae): two new species from Minas Gerais, Brazil, based on distinct lines of evidence and their relation with *C. muscicapa* and *C. longibracteatus

BÁRBARA LAÍS RAMOS BARBOSA^{1*}, REYJANE PATRÍCIA OLIVEIRA^{1*}, ANA ANGÉLICA SILVA MASCARENHAS¹, MARCOS DA COSTA DÓREA¹, FABIANO MACHADO MARTINS² & DANIELA SANTOS CARNEIRO-TORRES^{1*}

*Author for correspondence

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil; barbararamos00@hotmail.com, rpatricia@uefs.br, dscarneiro@hotmail.com

²Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Laboratório de Anatomia e Histoquímica Vegetal, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Abstract

Croton is a genus that belongs to the Euphorbiaceae family, which includes more than 1,300 accepted species and several new ones are being continuously described, mainly in Brazil. Two new species named *Croton aemulus* and *C. graomogolensis* are herein described in *C.* sect. *Barhamia* subsect. *Barhamia*, and compared to *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*. They were firstly revealed by analyses including population genetics and morphometrics, and are supported as new species by geographical and ecological patterns, as well as by anatomical and SEM features. Both new species are only known to Minas Gerais, Brazil, being *Croton aemulus* found in "cerrado de altitude" and *C. graomogolensis* in "campo rupestre" vegetation.

Key words: Crotonoideae, Espinhaço Range, campo rupestre, cerrado de altitude, hybridization

Introduction

Croton Linnaeus (1753: 1004) is a large genus of Angiosperms, with about 1,300 species, being the second more diverse in Euphorbiaceae family (Webster 1994, Berry *et al.* 2005, van Ee *et al.* 2011), belonging to the subfamily Crotonoideae Burmeister (1837: 247). It presents a pantropical distribution, predominating in dry forests around the world, less commonly found in humid environments (Webster 1993, Carneiro-Torres 2009). This is a very diverse genus in Brazil, where is represented by 311 species, including 249 endemics (Cordeiro *et al.* 2015). However, the total diversity of this genus is far to be completely known, as several new species are being continuously described to the neotropical region, including Brazil (Martínez Gordillo & de Luna 2005, Lima & Pirani 2008, Secco 2009, Caruzo *et al.* 2010, Carneiro-Torres *et al.* 2011, Silva *et al.* 2014).

Croton presents a very complex taxonomy, represented by herbs to trees or rarely vines (Carneiro-Torres 2009). Its species display typical trichomes, varying from stellates to lepidotes; translucent to red latex; leaves orange colored at senescence; and pseudoracemose inflorescences, often with staminate flowers at the apex and the pistillate ones at the base of the rachis; and stamped stamens on the floral button also easily define the group (Lima & Pirani 2003, van Ee *et al.* 2011).

The current infrageneric classification of this genus includes 40 sections, based on morphological and molecular information (van Ee *et al.* 2011). Among them, *Croton* sect. *Barhamia* (Klotzsch) Baillon (1858: 367) includes 84 species characterized by the absence of glands at the base of the leaf blades and apex of the petiole, bracts and sepals often glandular, as well as the number of stamens varying of (3)8 to 15(20) (van Ee *et al.* 2011). This section is composed by five subsections and among them, the subsect. *Barhamia* (Klotzsch) B.W. van Ee (2011: 816) comprises 19 species, occurring in Central and South America.

According to van Ee *et al.* (2011), *Croton* subsect. *Barhamia* is characterized by stellate indumentum, loosely or appressed-stellate, or less commonly glabrous; leaf margins serrate to dentate with a palmate venation; stipules glandular, glandular-lobed or dissected; sepals of pistillate flowers valvate to reduplicate-valvate, glandular, and some species display viscid foliage. They occur mainly in open and dry vegetation, between 100 to 1200 m.a.s.l. (van Ee *et al.* 2011). Sixteen species of this subsection are found in Brazil, for instance, *C. muscicapa* Müller Argoviensis (1874: 199) and *C. longibracteatus* Martínez Gordillo & de Luna (2005: 568), the main focus of the present work.

Historically, *Croton muscicapa* had its distribution known from Bahia to Minas Gerais states, along the Espinhaço range (Lima & Pirani 2003). Martínez Gordillo & de Luna (2005) recognized some specimens from Bahia previously identified as *C. muscicapa*, as the new species *C. longibracteatus*. Both species are currently cited as occurring in Bahia and Minas Gerais states (Cordeiro *et al.* 2015), but Carneiro-Torres (2009) had commented that they were frequently confused due vegetative and reproductive characters overlapping. As part of our recent field trips along the Espinhaço range and adjacent regions, we have confirmed a consistent variation between them and we found other populations morphologically distinguished by several characters, including environment conditions.

Using morphometrics and population genetics we understand that those divergent populations represent different taxonomic entities (see Barbosa *et al.* in prep.) and these differences are being reinforced here, using leaf anatomy and micromorphological patterns. Hence, the present paper formally describes and illustrates two new species of *Croton* from Minas Gerais, Brazil, related to *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*, occurring in Grão Mogol, Serranópolis de Minas and Jequitinhonha municipalities. Consecutively, we propose modifications in the circumscription of *Croton muscicapa* and *C. longibracteatus*, which are

being considered endemic to the Chapada Diamantina region, the northern portion of Espinhaço range in Bahia state.

Material and methods

Taxon sampling and morphological analyses

As part of our previous work (Barbosa *et al.* in prep.) we analyzed samples of 163 individuals distributed in 11 populations and 37 vegetative and reproductive variables by uni and multivariate morphometrics. In addition, the genetic structure was analyzed by ISSRs markers, and both data were decisive in order to discriminate the new species described here.

The present study was also based on examination of other herbarium samples housed at HUEFS, UEC, SP, SPF, RB, MOBOT-BR, MBM, BHCB (acronyms according to Thiers 2016+), and also on field trips along Bahia and Minas Gerais states, Brazil. We adopted the morphological terminology by Carneiro-Torres (2009), Martínez-Gordillo & de Luna (2005), Müller Argoviensis (1874). The distribution map was made using ArcGIS 10.3 (ESRI 2015).

Leaf anatomy and SEM analyses

The anatomical analyses were made using leaves collected from the third branch of 33 individuals, belonging to 11 populations (three of each one) that were included in our previous work, involving morphometrics and population genetics (Barbosa *et al.* in prep.). The samples used to anatomical analyses are identified with asterisk (*) in the examined materials available below.

The samples were fixed in FAA 50% for 24 hours. All the samples were exposed to vacuum chamber during fixation and then transferred to ethyl alcohol 70%. Fragments of the leaf petiole and blade were selected to analyses and transferred to tert-Butyl alcohol 70%,

where remained for approximately seven days, and then, were dehydrated in tert-butanol series upward (Johansen 1940) and placed in histological paraffin.

Transversal and longitudinal sections were made using rotary microtome with thickness of about 10 µm. Slides were stained with alcoholic safranin 1,5% and aqueous astra blue 1% (Gerlach 1969) and assembled in synthetic resin. Photomicrographs were made using microscope Olympus BX51 adapted with digital camera Olympus E330. In order to analyze the leaf surfaces in scanning electron microscope (SEM) we used samples mounted on stubs covered with carbon adhesive tape, coated with gold in sputtering Balzers SCD 050 and Denton Vacuum Dessk IV, and analyzed in SEM Zeiss LEO 1430VP.

These analyses were made respectively in the Anatomy Laboratory of the Federal University of the Recôncavo Baiano (UFRB) and the SEM Laboratory at the State University of Feira de Santana, Bahia (UEFS).

Taxonomic treatment

Key for identification of species related to *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*

1. Leaf blades with apex acuminate, base cordate to subcordate, margin dentate; stipules lanceolate, glandular; sepals of pistillate flower with glands long stipitate..... 2
- . Leaf blades with apex acute, base cordate, margin serrate; stipules glandular, resembling a bunch of grapes; sepals of pistillate flowers with glands short stipitate..... 3
2. Leaf blades with adaxial surface subglabrous; margin with one gland at the apex of each tooth; staminate flowers 6.09–11.09 mm long, stamens 5.77–11.52 mm long, bracts 3.76–12.18 mm long; pistillate flowers 8.89–17.71 mm long, presenting sepals with glands long stipitate; bracts 5.02–18.67 mm long; Bahia, "campo rupestre" vegetation, 780 to 1021 m..... *C. longibracteatus*

- Leaf blades with adaxial surface pubescent; margin with 3-4 glands at the apex of each tooth; staminate flowers 5.68–7.04 mm long, stamens 4.53–6.70 mm long, bracts 1.59-4.58 mm long; pistillate flowers 7.64–8.20 mm long, presenting sepals with glands short stipitate; bracts 1.63–7.12 mm long; Minas Gerais, "cerrado de altitude" vegetation, 1088 to 1134 m..... *C. aemulus*
3. Staminate flowers 4.02–6.84 mm long, stamens 11–12; pistillate flowers (-5.17) 6.0–10.10 mm long; Bahia, seasonal forests and caatinga vegetation, 593 to 740 m *C. muscicapa*
- Staminate flowers 3.44–4.47 mm long, stamens often 15-17; pistillate flowers (-3.58) 4.0–6.22 mm long; Minas Gerais, "campo rupestre" vegetation, 873 to 1100..... *C. graomogolensis*

Formal description of the new species

Croton aemulus Barbosa & Carn.-Torres, *sp. nov.* Fig. 1 A-E, 2 A-F, 3 B, 5.

Type:—BRAZIL: Minas Gerais: Jequitinhonha. Serra de areia no topo da serra, 16°20'11.2"S e 41°5'25.4"W, 1088m, 21 Nov. 2015, *B.L.R. Barbosa, D.S. Carneiro-Torres, M.S. Silva & J.F.C. Oliveira 19** (holotype: HUEFS!; isotypes: ALCB!, MBM!, SP!, SPF!, RB!, K!, M!, MO!, NY!, P!).

Diagnosis:—*Croton aemulus* differs from *C. longibracteatus* by having leaf blades with adaxial surface pubescent, leaf margins with 3-4 glands at the apex of each tooth; staminate and pistillate flowers, stamens and bracts with smaller sizes, and sepals of the pistillate flowers with glands short stipitate (*vs.* leaf blades with adaxial surface subglabrous, leaf margins with one gland sessile at the apex of each tooth; staminate and pistillate flowers, as well as stamens and bracts with bigger sizes and sepals of the pistillate flowers with glands long stipitate).

Description:—Monoecious shrub, erect, 1 m tall, viscid foliage, green-vinaceous, pubescent. Leaves simple, alternate, venation palmate, blade ovate, 31.57-70.77 x 21.18-47.23 mm, apex acuminate, base cordate to subcordate, margin with 3-4 glands at the apex of each tooth, pubescent on both surfaces; petiole 8.63-29.99 mm long, hirt-pubescent, eglandular; stipules lanceolate, glandular, 1.68–3.76 x 0.83-2.34 mm. Inflorescences terminal, bisexual, 25.69-83.29 mm long, hirt-pubescent, distal staminate flowers with the proximal pistillate flowers, distributed continuously along the rachis; bracts lanceolate. Staminate flowers yellowish-green, 5.68-7.04 mm long; pedicels 1.86-4.89 mm long; bracts 1.59-4.58 mm long; sepals 5, ovate, 2.59-4.14 x 1.61-2.48 mm; adaxial surface glabrous, abaxial surface pubescent with trichomes at the apex; petals 5, ovate, 2.94-4.03 x 1.97-2.98 mm; stamens 11-12, 4.53-6.70 mm long. Pistillate flowers green, 7.64-8.20 mm long; pedicels 2.91-4.62 mm long; bracts 1.63–7.12 mm long, fimbriate-glandular, glands long stipitate concentrated at the base; sepals 5, lanceolate, 6.40-9.06 x 1.15-2.20 mm, pubescent, margin glandular, glands short stipitate, reduplicate; petals absent; ovary globose, pubescent, styles 3, united at the base, stigma 8–11, glabrous. Capsules globose, 6.81-7.44 x 5.87- 6.02 mm, pubescent; seeds globose, 3.70-4.08 x 2.66-3.22 mm, smooth, carunculate.

Etymology:—The epithet “*aemulus*” made reference to the general and confuse morphology of this new species, which is quite similar to *Croton longibracteatus* and *C. graomogolensis*.

Morphological comments:—*Croton aemulus* is morphologically similar to *C. longibracteatus* on general aspect (Fig.4F-J), and they share several characters such as stipules lanceolate and glandular, leaf blades with margin dentate and similar number of stamens. They differ mainly by the presence, in the new species, of leaf blades with adaxial surface pubescent, margins with 3-4 glands at the apex of each tooth, pistillate flowers 7.64-

8.20 mm long, and sepals lanceolate, with glands short stipitate (*vs.* leaf blades with adaxial surface subglabrous, margins with one gland at the apex of each tooth, pistillate flowers 8.89-17.71 mm long, and sepals lanceolate, with glands long stipitate in *C. longibracteatus*). Both species share leaf anatomical characters as discussed below, however also present differences that support our taxonomic decisions.

Moreover, *Croton aemulus* is also similar to *C. graomogolensis* by the size of pistillate and staminate flowers and small bracts (Tab. 1). Therefore, it differs in having leaf blades pubescent on the adaxial surface, margins with 3-4 glands at the apex of each tooth, staminate flowers with 5.68-7.04 mm long and stamens 11-12 (*vs.* leaf blades glabrous to subglabrous on the adaxial surface, margin with 1-3 glands at the apex of each tooth, staminate flowers with 3.44-4.47 mm long and stamens often 15-17).

According to the results of morphometrics and genetic analyses (Barbosa *et al.* in prep.) there are several arguments to recognize *Croton aemulus* as an independent taxon. Although it displayed an intermediate position among the populations of *C. longibracteatus* and *C. graomogolensis* + *C. muscicapa*, based on both vegetative and reproductive characters, it has morphological characters that do not overlap with these species. Data of ISSR markers also revealed its intermediate position and shared genetic pool with *C. longibracteatus* and *C. graomogolensis*. In this way, we confirm this species as a divergent entity, which probably is a result of current or historical natural hybridization, involving *C. longibracteatus* (from Bahia) and the other new species following described (*C. graomogolensis*) which occurs in neighbor localities in the northern of Minas Gerais.

Geographic distribution, habitat and conservation:—*Croton aemulus* is restricted to the state of Minas Gerais, in the southeastern Brazil, only known at this moment to Jequitinhonha municipality (Fig. 5). It was only found in the Biological Reserve of "Mata Escura", included

in "cerrado de altitude" vegetation, typically with sandy soil in elevations of 1088 to 1134 m (Tab. 1). This species is here considered as Endangered CR (B1 B2 ab (ii)) according to IUCN (2012), because it is only known from a single locality, with an AOO (area of occurrence) estimated to be less than 15 km².

Paratypes:—BRASIL. Minas Gerais: Jequitinhonha, Reserva Biológica da Mata Escura, 16°26'2"S 41°0'12"W, 31 Dec. 2004, *Mello-Silva et al.* 437 (SP, SPF, RB); 16°20'18"S 41°05'23"W, 25 Mar. 2008, *Almeida et al.* 1308 (BHCB).

Croton graomogolensis Barbosa & Carn.-Torres, *sp. nov.* Fig. 1F-L, 2 G-L, 3 D, 5.

Type:—BRASIL: Minas Gerais: Grão Mogol. Início da Trilha do Barão, lado esquerdo, 16°33'24.8"S e 42°53'27.6"W, 873m, 20 Nov. 2015, *B.L.R. Barbosa, D.S. Carneiro-Torres, M.S. Silva, J.F.C. Oliveira* 17* (holotype: HUEFS!; isotypes: ALCB!, MBM!, SP!, SPF!, RB!, K!, M!, MO!, NY!, P!).

Diagnosis:—*Croton graomogolensis* differs from *C. muscicapa* in having smaller pistillate flowers, 3.58-6.22 mm long and stamens often 15–17 (vs pistillate flowers 6.0–10.10 mm long and stamens 11-12).

Description:—Monoecious shrub, erect, 2 m tall, viscid foliage, green-vinaceous, glabrous. Leaves simple, alternate, venation palmate, blade ovate, 19.16-48.16 x 14.82-37.47 mm, apex acute, base cordate, margin with 1-3 glands at the apex of each tooth, adaxial surface glabrous and subglabrous, abaxial surface pubescent to glabrous; petiole 9.04–32.57 mm long, glabrous, eglandular; stipules glandular resembling a bunch of grapes, 0.93–1.56 x 0.92–1.26 mm. Inflorescences terminal, bisexual, 11.72–59.06 mm long, glabrous, distal staminate

flowers with the proximal pistillate flowers, distributed continuously along the rachis; bracts lanceolate. Staminate flowers yellowish-green, 3.44–4.47 mm long; pedicels 0.84–2.43 mm long; bracts 1.38–1.84 mm long; sepals 5, ovate, 2.78–3.87 x 1.42–2.49 mm, both adaxial and abaxial surfaces glabrous; petals 5, oblong, 2.02–3.54 x 1.96–2.73 mm; stamens 15–17, 2.84–3.99 mm long. Pistillate flowers green (–3.58) 4.0–6.22 mm long; pedicels 1.53–8.42 mm long; bracts 1.12–2.72 mm long, fimbriate-glandular; sepals 5, 2.78–4.60 x 0.70–2.10, lanceolate, glabrous, margin glandular, short stipitate glands, not reduplicate; petals absent, ovary globose, glabrous, styles 3, united at the base, stigma 9–10. Capsules globose, 5.30 x 4.97 mm, glabrous; seeds globose 4.75 x 4.23 mm, smooth, carunculate.

Etymology:—The specific epithet made reference to Grão Mogol municipality, in Minas Gerais, Brazil, where this species was collected for the first time.

Morphological comments:—*Croton graomogolensis* is morphologically similar to *C. muscicapa* (Fig. 4A-E), due to the glabrous to pubescent indumentum, stipules glandular resembling a bunch of grapes and margin of the leaf blades serrate. The difference is based on the greater number of stamens, often 15–17, and pistillate flowers with 3.58–6.22 mm long in *Croton graomogolensis* (vs. 11–12 stamens and pistillate flowers with 5.17–10.10 mm long in *C. muscicapa*) (Tab. 1). They also share leaf anatomical characters, differing by some of them, as discussed below.

Our results of morphometrics and genetic analyses (Barbosa *et al.* in prep.) also supported *Croton graomogolensis* as a new species. It is very similar to *C. muscicapa* by vegetative characters and the main differences are regarding reproductive information, as commented above. In addition, they do not share the same genetic pool according ISSR markers and shows distinct distribution and ecological preferences, as commented below.

Geographic distribution habitat and conservation:—This species is restricted to the "campo rupestre" vegetation in Grão Mogol and Serranópolis de Minas, Minas Gerais, in southeastern Brazil (Fig. 5), in elevations of 873 to 1100 m (Tab. 1). It is here considered as Endangered EN (B2 ab (ii)) according to IUCN criteria (IUCN 2012) and is only known from two localities, with an AOO (area of occurrence) estimated to be less than 80 km². They occur within the State Reserves of Grão Mogol and Serra Nova, and we found herbaria specimens collected in those areas in 2007, however, we did not find this species in these reserves as part of our recent fieldtrips.

Paratypes:—BRASIL. Minas Gerais: Grão Mogol, Serra do Grão Mogol, 12 Nov. 1938, *Markgraf 3517* (RB); Serra do Espinhaço ca. 15 km oeste de Grão Mogol, 19 Feb. 1969, *Irwin et al. 23528*. (UEC 4602); Serra do Pipiri, 01 Jan. 1980, *Hatschbach 42882* (MOBOT-BR); em direção nordeste da cidade. 16°32'S 42°55'W, 22 May 1982, *Giulietti et al. CFCR 3425* (SP, SPF); próximo da saída, na Estrada para São Francisco Sá, 07 Jan. 1986, *Cordeiro et al. CFCR 9049* (SP, SPF); estrada para o Rio Ventania, rio temporário à leste da cidade, 25 Jul. 1986, *Mello-Silva et al. CFCR 9952* (SP, SPF); escarpas à direita do Riachão Ribeirão, 21 May 1987, *Mello-Silva & Pirani CFCR 10787* (SP, SPF); trilha dos Garimpeiros, 14 Jul. 1990, *Hatschbach 54268* (HUEFS, MBM); estrada da Serra do Barão, 16°32'S 42°55'W, 22 Mar. 2000, *Lima et al 93* (SPF). Serranópolis de Minas, Sete Quedas, 17 Apr. 2007, *Ribas & Silva 7755* (MBM).

The recircumscription of *Croton longibracteatus* and *C. muscicapa*

Croton longibracteatus Mart.-Gord. & de Luna, *Novon* 15: 568-571. 2005. Fig. 3A, 4F-J, 5.

Type:—BRASIL. Bahia: 7-10 km de Seabra-Itaberaba oeste de Lençóis, 27. May 1980, *R.M. Harley et al.* 22675 (holotype NY; isotype CEPEC!, IPA).

Description:—Monoecious shrub, erect, 1-3m tall, viscid foliage, green-vinaceous, hirto-pubescent to pubescent. Leaves simple, alternate, venation palmate, blade ovate, 21.41-98.73 x 15.52-51.99 mm, apex acuminate, base cordate to subcordate, margin dentate with one gland at the apex of each tooth, adaxial surface subglabrous, abaxial surface glabrous to pubescent, trichomes stellate; petiole 7.59-43.53 mm long, hirto-pubescent, eglandular; stipules lanceolate, glandular, 1.49-5.52 x 1.01-3.14 mm. Inflorescences terminal, bisexual, 20.83-138.06 mm long, hirto-pubescent, distal staminate flowers with the proximal pistillate flowers, distributed continuously along the rachis; bracts lanceolate. Staminate flowers yellowish-green, 6.09-11.09 mm long, pedicels 1.13-6.83 mm long; bracts 3.76-12.18 mm long; sepals 5, ovate, 3.28-5.67 x 1.45-3.61 mm, adaxial surface glabrous with trichomes only in the apex, abaxial surface glabrous; petals 5, ovate, 2.16-6.14 x 1.31-3.85 mm; stamens 11-12, 5.77-11.52 mm long. Pistillate flowers 8.89-17.71 mm long; pedicels 0.86-5.90 mm long; bracts pistillate flowers 5.02-18.67 mm, fimbriate-glandular glands; sepals 5, lanceolate, 9.63-17.90 x 0.84-3.32 mm, pilose, margin glandular, glands long stipitate, reduplicate; petals absent; ovary globose, pubescent; styles 3, united at the base, stigma 6-13, glabrous. Capsules globose, 4.43-8.24 x 4.78-8.86 mm, pubescent; seeds globose, 3.86-6.01 x 2.61-4.04 mm, smooth, carunculate.

Morphological comments:—Our results of morphometrics and ISSR analyses (*Barbosa et al.* in prep.) confirmed *Croton longibracteatus* as an independent species, but we are proposing some modifications regarding its original description made by Martínez-Gordillo & de Luna (2005), likewise in relation to its geographical distribution, as commented below.

Thus, the current morphological delimitation of *Croton longibracteatus* includes leaf blades with adaxial surface subglabrous, margins with one gland at the apex of each tooth, staminate flowers 6.09–11.09 mm long, stamens 5.77–11.52 mm long, bracts 3.76–12.18 mm long; pistillate flowers 8.89–17.71 mm long, bracts 5.02–18.67 mm long and sepals of the pistillate flowers with glands long stipitate.

Geographic distribution and habitat:—It occurs in "campo rupestre" vegetation from Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Fig. 5), in elevations of 780 to 1021 m (Tab. 1). We did not consider this species as threatened by extinction according to IUCN (2012) criteria, because it occurs in five localities within a protected area, the National Park of Chapada Diamantina.

Specimens examined:—BRAZIL. Bahia: Andaraí, ca. 2km S de Andaraí na estrada para Mucugê. 10 Oct. 2008, *Queiroz et al. 13590* (HUEFS); distrito Iगतú, estrada de chão de Mucugê para Iगतú, 13°01'43.5"S 41°21'38"W, 28 Jan. 2015, *Barbosa et al. 13** (HUEFS). Lençóis, BR 242, na beira da pista, do outro lado do Rio Mucugezinho, antes da placa do Orquidário, 12°27'52.3"S 41°25'45.4"W, 29 Jan. 2015, *Barbosa et al. 14** (HUEFS); trilha para a Pedra Verde, 30 Jan. 2015, *Barbosa et al. 15** (HUEFS). Mucugê, em frente ao Cemitério Bizantino. 13°00'406" 41°22'598"W, 26 Jan. 2015, *Barbosa et al. 11** (HUEFS); arredores da cidade, trilha para o Vale do Medonho, 13°05'21"S 41°22'41"W, 27 Jan. 2015, *Barbosa et al. 12** (HUEFS). Palmeiras, área em frente ao Rio Mucugezinho. 17 Nov. 2006, *Neves 149* (HUEFS).

Croton muscicapa Müll.Arg., in Mart. Fl. bras. 11(2): 199. 1874. Fig. 3C, 4 A-E, 5.

Type: —BRASIL. Bahia, in Serra do Gado Bravo prope Villa Nova da Rainha, s.d., *Martius* 2260 (holotype M!).

Description:—Monoecious shrub, erect, 1-2m tall, viscid foliage, green-vinaceous, glabrous to pilose. Leaves simple, alternate, venation palmate, blade ovate, 16.23-66.81 x 14.56-51.40 mm, apex acute, base cordate, margin serrate with 1-3 glands sessile at the apex of each tooth, glabrous to pubescent on both surfaces, trichomes stellate; petiole 9.92-44.01 mm long, glabrous to hirt-pubescent, eglandular; stipules glandular, resembling a bunch of grapes, 0.55-1.91 mm. Inflorescences terminal, bisexual, 14.25-109.32 mm long, glabrous to pilose; distal staminate flowers with the proximal pistillate flowers, distributed continuously along the rachis; bracts lanceolate. Staminate flowers 4.02-6.84 mm long; pedicel 1.85-5.94 mm long, bracts 0.94-3.58mm long; sepals 5, ovate, 2.66-4.88 x 1.21-2.91 mm, adaxial surface glabrous with trichomes at the apex, abaxial surface pubescent; petals 5, ovate, 2.88-5.47 x 1.86-3.94 mm; stamens 11-12, 3.43-6.24 mm long. Pistillate flowers (-5.17) 6.0-10.10 mm long; pedicel 2.85-12.16 mm long, bracts 0.82-5.79 mm long, fimbriate-glandular glands; sepals 5, 4.42-10.57 x 0.99-2.39 mm, lanceolate, glabrous to pubescent, margin glandular short stipitate, not reduplicate; petals absent; ovary globose, glabrous to pubescent; styles 3, united at the base, stigmas 9-15, glabrous. Capsules globose, 5.32-7.38 x 4.78-7.32 mm, glabrous to pubescent; seeds globose, 3.15-5.02 x 2.25-3.74, smooth, carunculate.

Morphological comments:—*Croton muscicapa* is mainly characterized by the presence of leaf blades with adaxial surface glabrous to pubescent, margins with one to three glands at the apex of each tooth, staminate flowers 4.02–6.84 mm long; stamens 11-12, pistillate flowers (-5.17) 6.0-10.10 mm long, bracts 0.82-5.79 mm long and sepals of the pistillate flowers with

glands short stipitate. Its limits are being modified here, supported by morphometrics and genetic information (Barbosa *et al.* in prep.). Besides the morphological differences commented above regarding *C. graomogolensis*, *C. muscicapa* is distinct from *C. longibracteatus* by width $\frac{1}{2}$ of leaf blades, width $\frac{1}{4}$ of bracteole and pedicel long of pistillate flower, longer in *C. muscicapa*. They also present distinct genetic pool, reinforcing its delimitation.

Geographic distribution and habitat:—It occurs in sazonal forest and "Caatinga" vegetation in Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (Fig. 5), in elevation of 593 to 740 m (Tab 1). We also did not consider this species as threatened by extinction according to IUCN (2012) criteria, due its occurrence in six localities within a protected area, the National Park of Chapada Diamantina.

Specimens examined:—BRAZIL. Bahia: Jacobina, estrada para a antiga Companhia Força Luz, 11°10'775"S 40°29'911"W, 16 Nov. 2014, *Barbosa et al.* 01* (HUEFS); Povoado de Itaitú, Cachoeira Vêu de Noiva, 11°19'944"S 40°30'198"W, 16 Nov. 2016, *Barbosa et al.* 04* (HUEFS). Miguel Calmon, 14 Jan. 1991, *Miranda & Esteves* 331 (HUEFS). Palmeiras, Serra Negra, 27 Apr. 2015, *Barbosa et al.* 16* (HUEFS). Pindobaçú, Trilha para a Serra da Fumaça, 10°40'080"S 40°21'724"W, 17 Nov. 2014, *Barbosa et al.* 08* (HUEFS). Rui Barbosa, 28 May 2005, *Costa* 27 (HUEFS). Tapiramutá, estrada de chão Bonito-Tapiramutá 25km de Bonito, 27 Jun. 2005, *Carneiro-Torres et al.* 585 (HUEFS).

Leaf anatomy and SEM patterns

The four analyzed species displayed leaf blades with epidermis unstratified with thick cuticule, trichomes stellate, stomata paracytic, laticifers non-articulated, dorsiventral

mesophyll with idioblasts and druses crystals (Tab. 2; Fig. 6 and 7). The organization of vascular bundle is collateral in both leaf blade and petiole; the leaf blades present concave glands and the petiole has a rounded shape in all of them. All these characters are in agreement with general findings of Metcalfe & Chalk (1950) for *Croton* species.

On the other hand, these species differ regarding the position of stomatas, petiole surfaces, size of glands at margins of leaf blades and abundance of secondary compounds (Tab. 2). *Croton longibracteatus* presents greater amount of secondary compounds and glands at margins of leaf blades long stipitate, while other species showed lower quantity of secondary compounds and glands at margins of leaf blades sessile or short stipitate. *Croton aemulus* and *C. longibracteatus* shared hipostomatic leaf blades and petiole rounded; however, *C. aemulus* had lower amount of secondary compounds and glands at margins of leaf blades short stipitate. *Croton muscicapa* and *C. graomogolensis* shared amphistomatic leaf blades, nonetheless *C. muscicapa* had a furrowed petiole, glands at margins of leaf blades sessile and concave, while *C. graomogolensis* displayed petiole surface with projection, glands at margins of leaf blades short stipitate, with straight margin and raised center (Tab.2; Fig, 6 and 7).

The presence of different types of trichomes, such as stellate, lepidotes and its variations; sclereids crossing the mesophillum, idioblasts containing lipophilic material or crystals and diverse secretory structures as laticiferous and nectaries are common characters of *Croton* species (Metcalfe & Chalk 1950). Secretory structures have been commonly used in taxonomy and phylogeny of Euphorbiaceae groups, for example, vascularized floral nectaries exclusive for *Croton*, vs. not vascularized in *Astraea* Klotzsch (1841: 194) (De-Paula et al. 2011).

Recent studies made by Vitarelli et al. (2015) involved species belonging to *Croton* sect. *Cleodora* (Klotzsch) Baillon (1858:369) and *C.* sect. *Lamprocroton* (Müller

Argoviensis) Pax (1890:93). These authors recognized the utility of the characters of secretory structures to delimitate these groups, identifying some glands as colleters. Complementary studies must involve the identification of chemical elements secreted by the glands found in *C. longibracteatus*, *C. muscicapa* and the two new species related to them, in order to certify the occurrence of colleters also in *C. sect. Barhamia*.

Acknowledgments

We are grateful to the colleagues that contributed in fieldtrips and the curators of herbaria consulted; to Natanael Nascimento Santos and Lucas Menezes for botanical illustrations; Naron Menezes for preparing the map; and Andreza Matos for English revision. The following institutions provided financial support to this work: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), for fellowship given to BLRB; CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) as part of PPBio Semiárido network (457427/2012-4) and Flora da Bahia Program (grant 483909/2012-2) for given financial support. RPO also thank CNPq by a productivity grant (PQ1D).

References

- Baillon, H.E. (1858) Étude générale du groupe des Euphorbiacées. *Librairie de V. Masson*, Paris, p. 369.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.50439>
- Berry, P.E., Hipp, A.L., Wurdack, K.J., Van Ee, B. & Riina, R. (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae *sensu stricto*) using *ITS* and *trnL-trnF* DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92: 1520-1534.
<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.92.9.1520>

- Burmeister, H.C.C. (1837) *Handbuch der Naturgeschichte. Part. 1 Mineralogie und Botanick*, p.247.
- Carneiro-Torres, D.S. (2009) *Diversidade de Croton L. (Euphorbiaceae) no Bioma Caatinga*. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, pp. 296.
- Carneiro-Torres, D.S., Cordeiro, I., Giulietti, A.M., Berry, P.E. & Riina, R. (2011) Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia* 63: 122-132.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12228-010-9145-1>
- Caruzo, M.B.R., Cordeiro, I., Berry, P.E. & Riina, R. (2010) A new species of *Croton* section *Cleodora* (Euphorbiaceae s.s) from Minas Gerais, Brazil. *Phytotaxa* 3: 23-33.
<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.3.1.3>
- Cordeiro, I., Secco, R., Cardiel, J.M., Steinmann, V., Caruzo, M.B.R., Riina, R., Lima, L.R. de, Maya-L, C.A., Berry, P.E., Carneiro-Torres, D.S., Silva, O.L.M., Sales, M.F.D., Silva, M.J. da, Sodr e, R.C., Martins, M.L.L., Pscheidt, A.C., Athi e-Souza, S.M., Melo, A.L.D., Oliveira, L.S.D., Paula-Souza, J. & Silva, R.A.P. (2015) *Croton in Flora do Brasil 2020 em constru o*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB17497>. (acessado: 21 Out. 2016).
- De-Paula, O.C., Sajo, M.G., Prenner, G., Cordeiro, I. & Rudall, P.J. (2011) Morphology, development and homologies of the perianth and floral nectaries in *Croton* and *Astraea* (Euphorbiaceae – Malpighiales). *Plant Systematic and Evolution* 283: 179-202.
- ESRI (2015) *ArcGIS*, version 10.3. Redlands, California: Environmental Systems Research Institute.
- IUCN (2012) *The IUCN red list of threatened species*, version 2012.1. IUCN Red List Unit, Cambridge U.K. Available from: <https://www.iucnredlist.org/> (accessed: 2 March 2016).

- Gerlach, G. (1969) *Botanische Mikrotechnik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 344.
- Johansen, D.A. (1940) *Plant microtechnique*. *Mc Graw Hill*, New York. pp. 493-502.
- Klotzsch, J.F. (1853) *Barhamia* Klotzsch in Seemann. *Botany of the Voyage of H.M.S. Herald*. 3: 104.
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. (2003) O gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 299-344.
<http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9052.v21i2p299-344>
- Lima, L.R. & Pirani, J.R. (2008) Three New Species of *Croton* L. (Euphorbiaceae) from Brazil. *Kew Bulletin* 63: 121-129.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12225-007-9008-4>
- Linnaeus, C. (1753) *Species Plantarum*. Laurentii Salvii, Stockholm 2: 1004.
- Martínez Gordillo, M. & de Luna, E. (2005) Espécie nueva de *Croton* (Euphorbiaceae) de Brasil. *Novon* 15: 568-571.
- Metcalf, C.R. & Chalk, L. (1950) *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Vol. 1. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Müller Argoviensis, J. (1874) *Croton muscicapa*. *Flora Brasiliensis*, v.11, Part II, Fasc. 61, pp. 199-200.
- Pax, F. (1890) Euphorbiaceae. In *Die Naturl. Pflanzenfamilien* (A. Engler & K. Prantl, eds.). 1 ed., 3: 1-119.
- Secco, R.S. (2009) Uma nova espécie de *Croton* sect. *Geiseleria* (Euphorbiaceae) da Amazônia Oriental brasileira. *Revista Brasileira de Botânica* 32: 249-252.
- Silva, M.J.S., Sodré, R.C. & Sales, M.F. (2014) A new Species of *Croton* L. (Euphorbiaceae s.s) from the Brazilian Cerrado. *Systematic Botany* 39: 216-221.
<https://doi.org/10.1600/036364414X678125>

- Thiers, B. (2016+) *Index Herbariorum: a global directory of public 22 herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/> (accessed 15 January 2016).
- Van Ee, B.W., Riina, R. & Berry, P.E. (2011) A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60: 791-823.
- Vitarelli, N.C., Riina, R., Caruzo, M.B.R., Cordeiro, I., Fuertes-Aguilar, J. & Meira, R.M.S.A. (2015) Foliar secretory structures in Crotonae (Euphorbiaceae): diversity, anatomy and evolutionary significance. *American Journal of Botany* 102(6): 833-847.
- Webster, G.L. (1993) A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793-821.
- Webster, G.L. (1994) Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 1-144.

TABLE 1. Morphological comparisons between *Croton muscicapa*, *C. longibracteatus*, and the new species *C. aemulus* and *C. graomogolensis*.

Character/Species	<i>C. longibracteatus</i>	<i>C. aemulus</i>	<i>C. muscicapa</i>	<i>C. graomogolensis</i>
Leaf blade adaxial surface	Subglabrous	Pubescent	Glabrous – pubescent	Glabrous – subglabrous
Marginal blade gland	1 gland	3-4 glands	1-3 glands	1-3 glands
Staminate flowers	6.09–11.09 mm	5.68–7.04 mm	4.02–6.84 mm	3.44–4.47 mm
Stamens	11-12 5.77–11.52 mm	11-12 4.53–6.70 mm	11-12 3.43-6.24 mm	15-17 2.84-3.99 mm
Pistillate flowers	8.89–17.71 mm	7.64–8.20 mm	(-5.17) 6.0–10.10 mm	(-3,58) 4.0–6.22 mm
Sepals of the pistillate flowers	Reduplicate	Reduplicate	Not reduplicate	Not reduplicate
Sepals gland of the pistillate flowers	Long stipitate	Short stipitate	Short stipitate	Short stipitate
Bracts pistillate flowers size	5.02–18.67 mm	1.63–7.12 mm	0.82-5.79 mm	1.12-2.72 mm
Distribution	Bahia	Minas Gerais	Bahia	Minas Gerais
Vegetation	Campo rupestre	Cerrado de altitude	Sazonal Forest and Caatinga	Campo rupestre
Elevation	780–1021 m	1088 m	593–740 m	873 m

TABLE 2. Micromorphological comparisons based on leaf anatomy and SEM analyses.

Characters/ Species	<i>C. longibracteatus</i>	<i>C. aemulus</i>	<i>C. muscicapa</i>	<i>C. graomogolensis</i>
Epidermal	Unstratified, thick cuticle	Unstratified, thick cuticle	Unstratified, thick cuticle	Unstratified, thick cuticle
Trichome leaf	Stellate	Stellate	Stellate	Stellate
Stomata	Paracytic	Paracytic	Paracytic	Paracytic
Leaf on stomata position	Hipostomatic	Hipostomatic	Amphistomatic	Amphistomatic
Laticiferous	Articulated nonanastomosed laticifers	Articulated nonanastomosed Laticifers	Articulated nonanastomosed laticifers	Articulated nonanastomosed laticifers
Mesophyll	Dorsiventral Idioblasts with druses crystals	Dorsiventral Idioblasts with druses crystals	Dorsiventral Idioblasts with druses crystals	Dorsiventral Idioblasts with druses crystals
Vascular bundle: leaf and petiole	Collateral	Collateral	Collateral	Collateral
Petiole	Rounded, smooth	Rounded, Smooth	Rounded with furrow	Rounded with projection
Marginal leaf gland	Long stipitate, concave	Sessile, Concave	Sessile, Concave	Short stipitate, concave with straight margin and raised center
Secondary compounds	Much	Little	Little	Little

Figure legends

FIGURE 1. *C. aemulus* and *C. graomogolensis*. **A-E** *C. aemulus* (Barbosa et al. 19, HUEFS). **A.** Habit; **B.** Stipules glandular lanceolate; **C.** Bracts; **D.** Staminate flower; **E.** Pistillate flower. **F-L** *C. graomogolensis* (Barbosa et al. 17, HUEFS). **F.** Habit; **G.** Stipules glandular like a brunch of grapes; **H.** Bracts in frontal view; **I.** Bracts in lateral view; **J.** Staminate flower; **K.** Pistillate flower; **L.** Ovary and styles. Drawing by Natanael Nascimento.

FIGURE 2. *C. aemulus* and *C. graomogolensis*. **A-F** *C. aemulus*. **A.** Habit; **B.** Inflorescences with staminate flowers and bracts. **C.** Inflorescences with flower-bud, staminate and pistillate flowers. **D.** Leaf and stipules, branch pubescent. **E-F.** Pistillate flowers. **G-L.** *C. graomogolensis*. **G.** Habit. **H.** Inflorescences with flower-bud and staminate flower. **I.** Inflorescences with flower-bud, staminate flowers and fruit. **J.** Pistillate flowers and stipules. **K.** Pistillate flowers. **L.** Branch. Photos by D.S. Carneiro-Torres and B.L.R Barbosa.

FIGURE 3. Morphological comparisons between species. Leaf margin, stipules, sepals and bracts. **A.** *C. longibracteatus* (Barbosa et al. 11). **B.** *C. aemulus* (Barbosa et al. 19). **C.** *C. muscicapa* (Barbosa et al. 04). **D.** *C. graomogolensis* (Barbosa et al. 17). Scale bars = 1mm.

FIGURE 4. *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*. **A-E.** *C. muscicapa*: **A.** Habit. **B.** Leaf glabrous. **C.** Stipules glandular like a brunch of grapes. **D.** Staminate flower. **E.** Pistillate flower. **F-J.** *C. longibracteatus*. **F.** Habit. **G.** Leaf with details of the adaxial surface subglabrous and abaxial surface pubescent. **H.** Stipules glandular lanceolate. **I.** Staminate flower. **J.** Pistillate flowers without one sepal. Drawing by Lucas Menezes.

FIGURE 5. Distribution map of *C. aemulus*, *C. graomogolensis*, *C. muscicapa* and *C. longibracteatus*. Symbol (●) is for collected areas.

FIGURE 6. Micromorphological comparisons based on petiole (A-D) of *C. longibracteatus* (A), *C. aemulus* (B), *C. muscicapa* (C) and *C. graomogolensis* (D). Scale bars: 200µm.

FIGURE 7. Micromorphological comparisons based on vein (A-D) and glands of leaf margins (E-H) in *C. longibracteatus* (A, E), *C. aemulus* (B, F), *C. muscicapa* (C, G) and *C. graomogolensis* (D, H). Scale bars: 200µm.

FIGURE 8. Micromorphological comparisons based on SEM on adaxial (A, D, G, I) and abaxial surfaces (B, E, H, K), and glands on leaf margins (C, F, I, K) of *C. longibracteatus* (A-C), *C. aemulus* (D-F), *C. muscicapa* (G-I) and *C. graomogolensis* (J-L). Scale bars: 100µm.

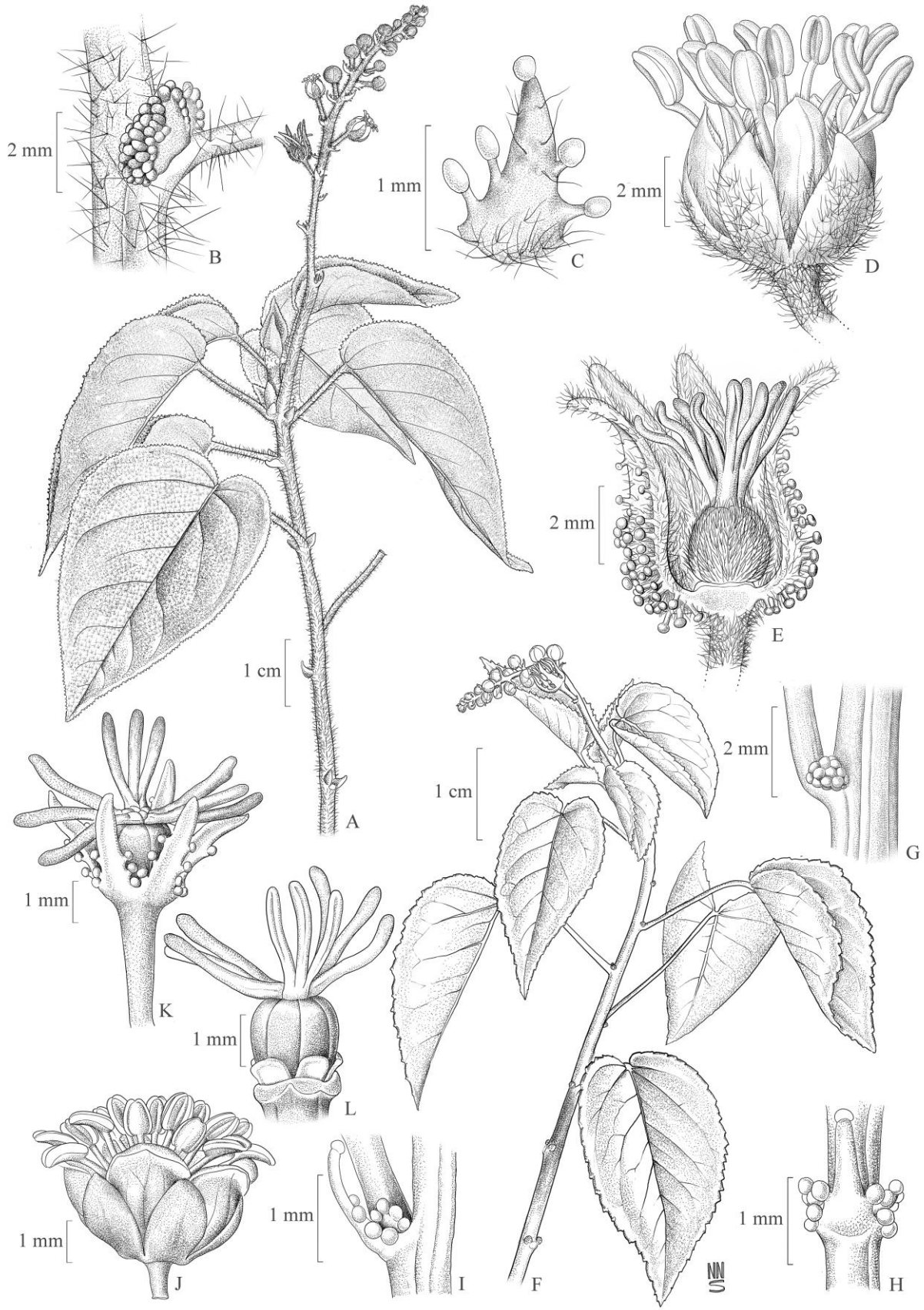


Figure 1



Figure 2

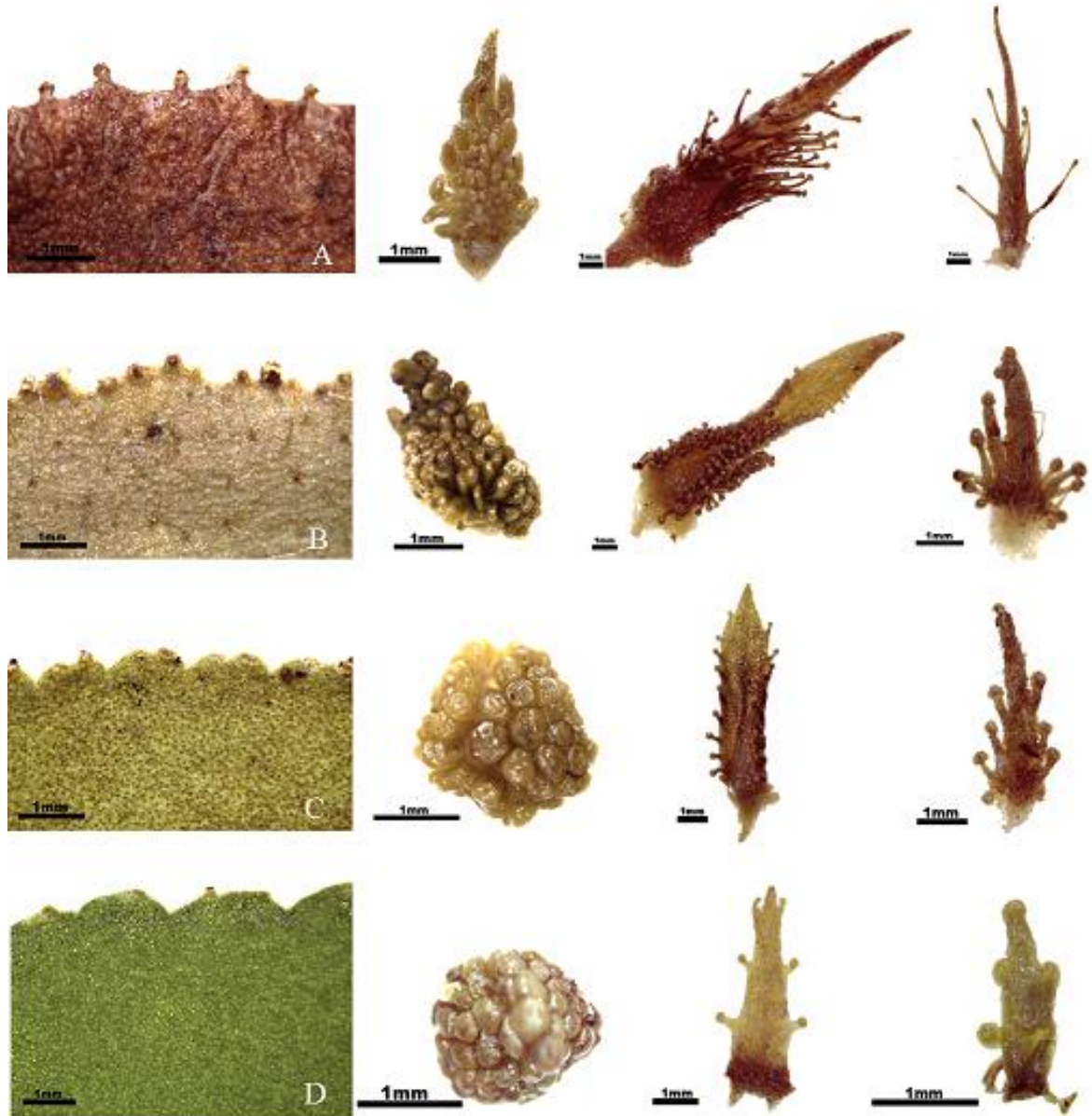


Figure 3

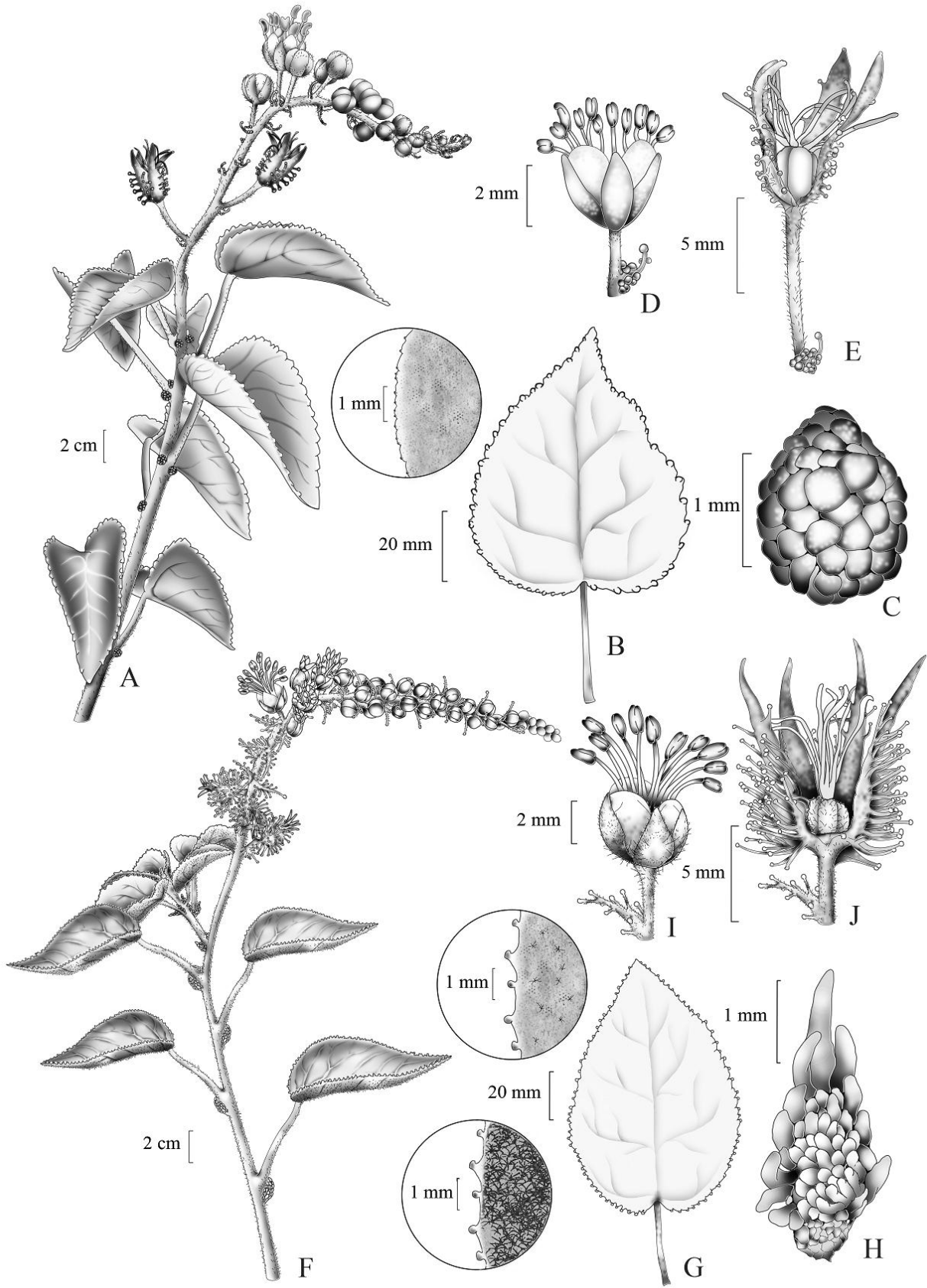


Figure 4

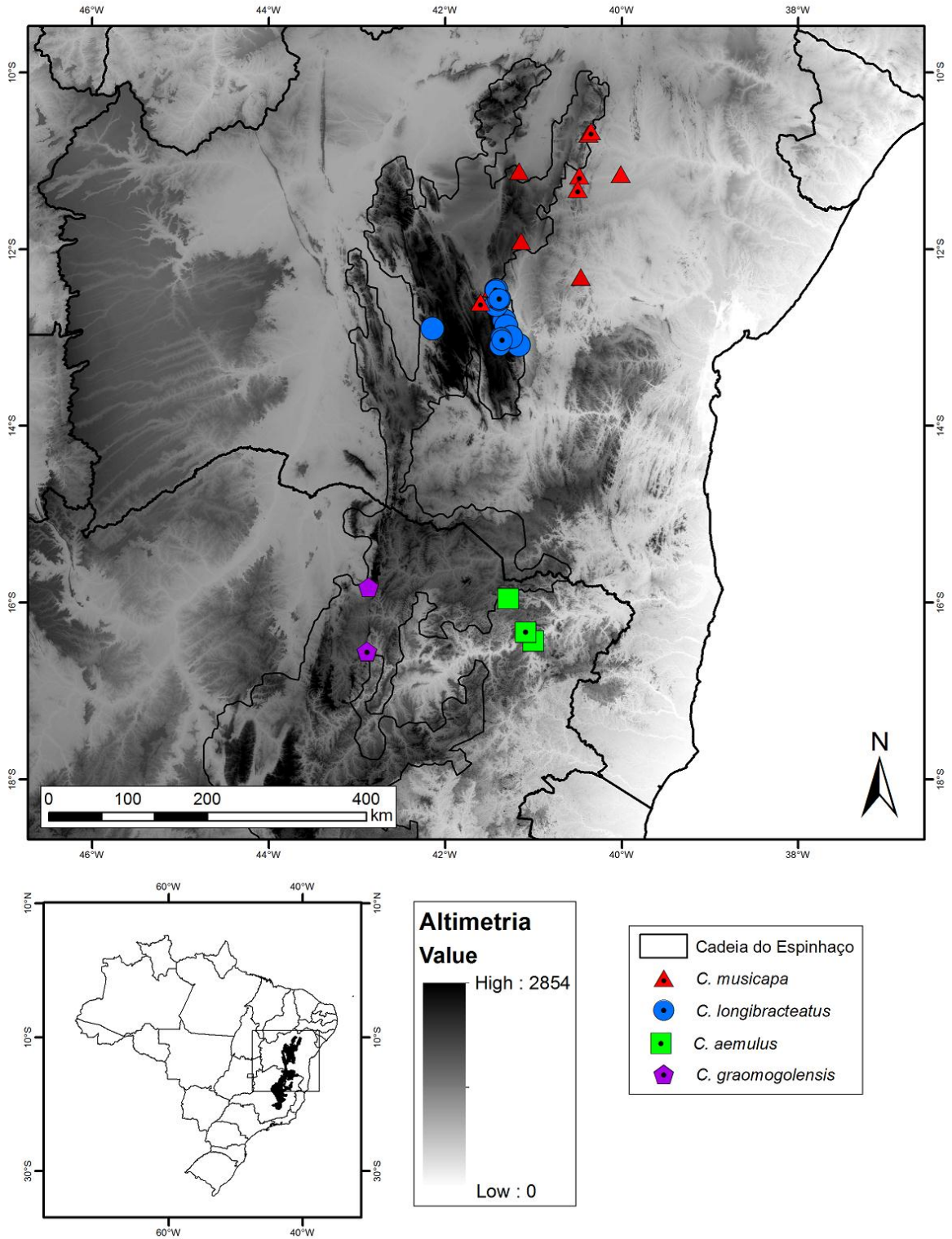


Figure 5

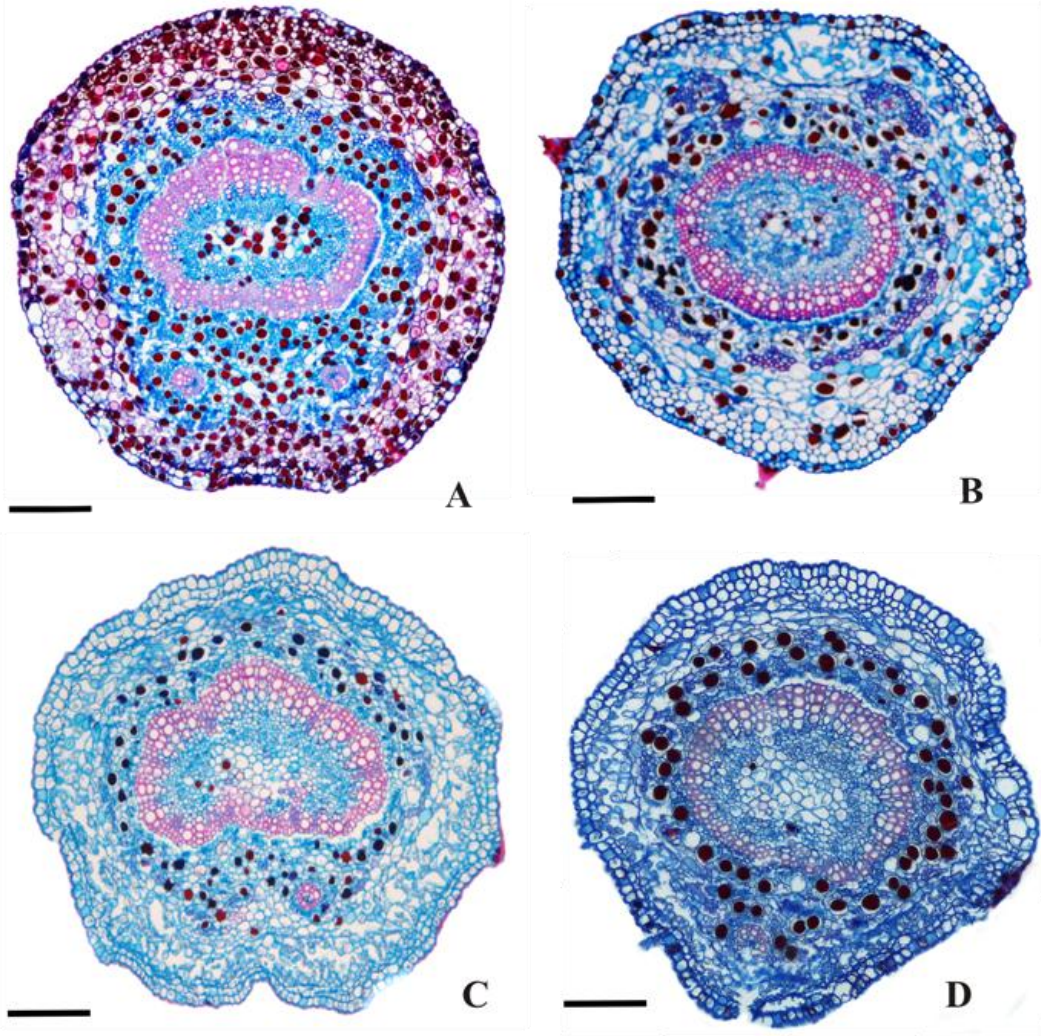


Figure 6

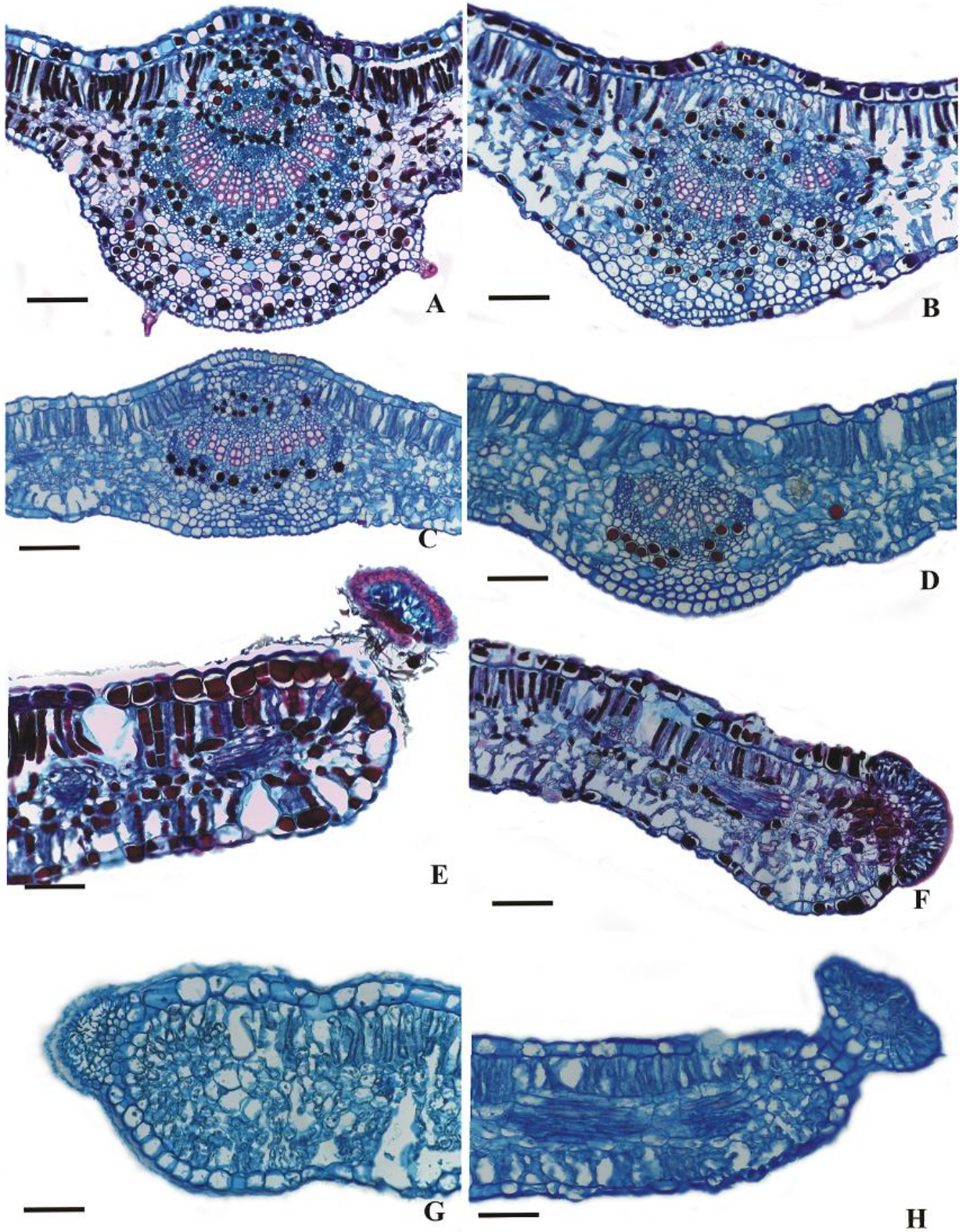


Figure 7

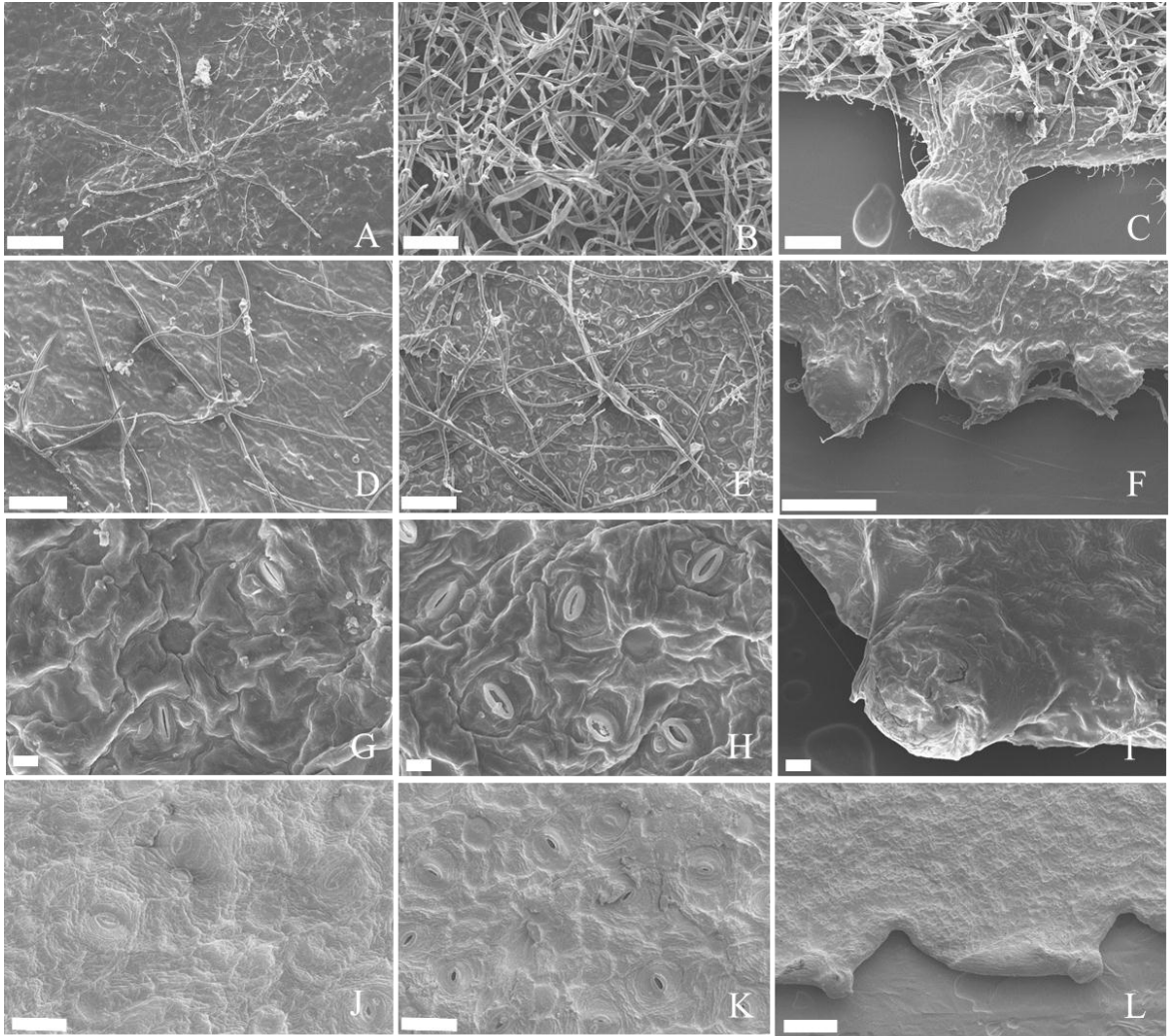


Figure 8

CONCLUSÃO GERAL

A maior dificuldade no estudo do gênero *Croton* está na delimitação de algumas espécies, principalmente quando estas apresentam grande variação morfológica. Como observado, *C. muscicapa* e *C. longibracteatus* são espécies que apresentam variação em suas estruturas morfológicas, o que muitas vezes dificulta a identificação correta das mesmas. No presente trabalho conseguimos alcançar resultados satisfatórios quanto à delimitação dessas duas espécies, que subsidiarão estudos gerais que envolvem as mesmas, incluindo levantamentos florísticos e estudos aplicados que visem sua conservação e utilização.

Duas novas espécies foram descritas, muito relacionadas a *C. longibracteatus* e *C. muscicapa*, sendo uma delas *C. aemulus*, resultado de hibridação natural entre a primeira e *C. graomogolensis*, a outra nova espécie descrita. Foi possível constatar que os caracteres reprodutivos são mais consistentes para a separação dessas espécies, sendo os caracteres vegetativos muito variáveis, e menos informativos para a taxonomia do grupo. A análise de estruturação genética e caracteres da anatomia e micromorfologia foliar subsidiaram a delimitação aqui proposta para esse grupo, assim como as diferenças observadas na distribuição geográfica, nas condições ecológicas, como o tipo de vegetação e a altitude das áreas onde essas espécies foram encontradas.

Além da revisão sobre os limites morfológicos de *C. muscicapa* e *C. longibracteatus*, a distribuição geográfica das mesmas também foi aqui revisada. Assim, essas duas espécies são aqui consideradas exclusivas da Bahia, Brasil, conhecidas somente de áreas da Chapada Diamantina e áreas adjacentes, enquanto que as novas espécies *C. aemulus* e *C. graomogolensis* são conhecidas, até o momento, apenas para a região norte do estado de Minas Gerais.

Desse modo, o trabalho consiste de uma grande contribuição na certificação da identidade taxonômica das espécies analisadas, e isso facilitará bastante o reconhecimento das mesmas e evitará futuras identificações incoerentes.