

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL



# DELIMITAÇÃO DE TÁXONS DO COMPLEXO *MANIHOT PENTAPHYLLA* Pohl (EUPHORBIACEAE Juss.) COM BASE EM DADOS MORFOLÓGICOS E ANATÔMICOS

ELIFALETE SERAFIM AZEVEDO

Goiânia, GO Março, 2017





#### TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

#### [X] Dissertação [] Tese 1. Identificação do material bibliográfico:

#### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Elifalete Serafim Azevedo

Título do trabalho: Delimitação de táxons do complexo Manihot pentaphylla Pohl (Euphorbiacae Juss.) com base em dados morfológicos e anatômicos

#### 3. Informações de acesso ao documento:

[]NÃO<sup>1</sup> Concorda com a liberação total do documento [x] SIM

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arguivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

<u>Elifalite S. Azuedo</u> Assinatura do (a) autor (a)

Data: 13 /04 /2017

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

### ELIFALETE SERAFIM AZEVEDO

# DELIMITAÇÃO DE TÁXONS DO COMPLEXO *MANIHOT PENTAPHYLLA* Pohl (EUPHORBIACEAE Juss.) COM BASE EM DADOS MORFOLÓGICOS E ANATÔMICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Vegetal, Área de Concentração - Botânica Estrutural.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dalva Graciano-Ribeiro Coorientador: Prof. Dr. Marcos José da Silva

> Goiânia, GO Março, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Azevedo, Elifalete Serafim
Delimitação de táxons do complexo Manihot pentaphylla Pohl
(Euphorbiacae Juss.) com base em dados morfológicos e anatômicos
[manuscrito] / Elifalete Serafim Azevedo. - 2017.
9, 78 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Dalva Graciano Ribeiro; co-orientador Marcos José da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2017. Bibliografia.

Inclui mapas, fotografias, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Anatomia. 2. Complexo específico. 3. Delimitação de táxons. 4. Euphorbiaceae. 5. Órgãos vegetativos. I. Graciano Ribeiro, Dalva, orient. II. Título.



se-á quando da entrega na secretaria do PPGBV da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções, em trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, ás <u>16</u> horas e <u>30</u> min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, assistente administrativa do PPGBV lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor. 

fiaciano Ribeito Profa. Dra. Dalva Graciano Ribeiro Presidente da Banca

ICB/UFG

Prof. Dr. Heleno Dias Ferreira

**ICB/UFG** 

Profa. Dra. Renata Maria Strozi Alves Meira UFV/MG

### Dedico

À minha mãe, a quem tudo devo e por acreditar que a educação é o melhor caminho a ser trilhado;

Ao meu marido, por mostrar que os sonhos devem ser almejados e alcançados;

À minha querida amiga Marilda Barros pelo incentivo e por me conduzir ao caminho da Botânica.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e a Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

A Pró-Reitoria de Administração e Finanças (PROAD) da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo auxílio com o transporte para a realização de visitas ao campo de estudo.

À minha orientadora, professora Dalva Graciano Ribeiro, pelas orientações e ensinamentos.

Ao professor Marcos José da Silva, pela orientação, apoio, cuidado, auxílio na identificação dos materiais de estudo e pelas críticas sempre construtivas.

Aos professores do Departamento de Botânica pelos ensinamentos.

Agradeço pelo amor, cuidado, compreensão, e por onde tudo começou, ao meu esposo e amigo Daniel Silva Barbosa.

À minha mãe Rosalina Serafim Azevedo, pelo amor incondicional e por sempre me apoiar.

À minha querida amiga professora Marilda Barros pela inspiração e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Morfologia Vegetal: Gustavo, Lorena e Celine pelo apoio, companhia e auxílio com os trabalhos de campo e em especial à Talita, pelas longas horas que passamos no campo realizando coletas botânicas e pela atenção, disposição e auxílio na identificação e obtenção dos materiais para estudo.

À Priscila e Jéssica, colegas de laboratório, pela amizade e companhia sempre muito agradável. Aos meus queridos amigos: Beryl, Thiago, Rogério e Rayna, pelas gentilezas, companhia, parceria, pelos momentos de compartilhamento das nossas experiências, angustias, desafios e conquistas, e pelos momentos de descontração e alegria. Vocês são amigos que o programa me trouxe de presente.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

# ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Estudos anatômicos em <i>Manihot</i>	3
2.1.1. Caule	3
2.1.2. Lâmina foliar	5
2.1.3. Pecíolo	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
TABELAS	13
4. RESULTADOS	16

# **ARTIGO 1**

Delimitação de táxons do complexo Manihot pen	taphylla (Euphorbiaceae) com base em
anatomia caulinar e foliar	17
Resumo	
Abstract	
INTRODUÇÃO	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	
Caracteres anatômicos	
Caule	
Pecíolo	
Lâmina foliar	
Nervura central	

Epiderme em vista frontal	
Análise micromorfológica do padrão de cera epicuticular	27
Testes histoquímicos	27
Chave dicotômica	27
DISCUSSÃO	
Abordagem taxonômica	
Abordagem ecológica	32
AGRADECIMENTOS	
REFERÊNCIAS	
TABELAS E FIGURAS	

# **ARTIGO 2**

Delimitation of taxa in <i>Manihot pentaphylla</i> complex (Euphorbiaceae)	based	on
morphological data	•••••	54
ABSTRACT	•••••	55
INTRODUCTION		55
MATERIAL AND METHODS		57
RESULTS AND DISCUSSION		58
TAXANOMIC TREATMENT		58
Manihot graminifolia Chodat & Hassl	• • • • • • • • • • • • • • •	58
Manihot pentaphylla Pohl	•••••	60
<i>Manihot rigidula</i> Müll Arg	•••••	62
Manihot tenuifolia Pohl	•••••	64
KEY IDENTIFICATION	•••••	66
ACKNOWLEDGEMENTS		66
REFERENCES		66
TABLES AND FIGURES		69
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS		78

### LISTA DE TABELAS

# **REVISÃO DE LITERATURA**

Tabela 1	l.	Caracteres	anatômicos	d	o cau	le d	e t	áxons	de	Manihot	estudados
anteriorme	nte			•••••					•••••		13
Tabela 2.	. (	Caracteres	anatômicos d	la 1	âmina	foliar	de	táxons	de	Manihot	estudados
anteriorme	nte.			•••••							14
<b>Tabela 3</b> anteriorme	s <b>.</b> nte	Caracteres	anatômicos	do	) pecí	olo (	1e	táxons	de	Manihot	estudados

### **ARTIGO 1**

 Tabela 1. Matriz de presença (1) e ausência (0) dos caracteres morfológicos e anatômicos dos táxons do complexo *Manihot pentaphylla*.
 39

# ARTIGO 2

Table	1. Manihot specimens studied	9
Table	2. Anatomical features of the species studied6	5

#### LISTA DE FIGURAS

#### **ARTIGO 1**

Figura 3 - Seção transversal do pecíolo de Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (a), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (b), Manihot pentaphylla subsp. rigidula (c) e Manihot *pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**) evidenciando o contorno côncavo-convexo (**a**) e circular (**b**-**d**) e Figura 4 - Seção transversal do pecíolo de Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (a, e), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (**b**, **f**), Manihot pentaphylla subsp. rigidula (**c**, **g**) e Manihot pentaphylla subsp. tenuifolia (d, h). a-d, visão detalhada da epiderme (Ep), do córtex evidenciando parênquima subepidérmico (Ps), colênquima angular (Cg), parênquima interno (Pi) e periciclo (Pr). **a1**, fibras gelatinosa do periciclo. Cristal do tipo drusa (**c1**). **e-h**, detalhe do feixe vascular evidenciando floema (F), xilema secundário (Xs), metaxilema (Mx) e protoxilema (Px). is, idioblasto secretor; b, bainha parenquimática; c, câmbio vascular; L, laticífero. Barra: 100 µm em **a-h** e **a1**; 50 μm em **c1**......44 Figura 5 - Secção transversal da lâmina foliar de Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (a, e), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (b, f), Manihot pentaphylla subsp. tenuifolia (c, h) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**d**, **g**). Ala foliar arqueada (**a-c**) e plano (**d**). **a**, **c**, margem da ala foliar não revoluta (Mn). **b**, **d**, margem da ala foliar revoluta (Mr). **e**, mesofilo isobilateral. **f**, h, mesofilo dorsiventral. CEC, células epidêmicas comuns; PP, parênquima paliçádico; PE parênquima lacunoso; Fvg, feixe vascular de grande calibre; Fvm, feixe vascular de médio calibre;

Fvp, feixe vascular de pequeno calibre; P, papilas; eb, extensão da bainha; Cg, colênquima angular. Barra: 1000 μm em **a-d**; 100 μm em **e-h**......45

Figura 8 - Secção transversal da nervura central de Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (a, e), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (b, f), Manihot pentaphylla subsp. tenuifolia (c, g) e Manihot pentaphylla subsp. rigidula (d, h). a-d, detalhe da face abaxial evidenciando as células epidérmicas comuns (Cec), colênquima angular (Cg), parênquima fundamental (P). **b1**, cutícula com ornamentação. c1, cutícula lisa. e-h, detalhe do feixe vascular em forma de arco aberto. Fp, floema primário; Px, protoxilema; Mx, metaxilema; Fva, feixe vascular acessório; c, cristais; L, laticífero; is, idioblasto secretor. Barra = 100  $\mu$ m em **a-h**; 50  $\mu$ m em **b1** e **c2**......48 **Figura 9** - Vista frontal da epiderme adaxial e abaxial da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. graminifolia (**a**, **f**, **n**); Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (**b**, **g**); Manihot pentaphylla subsp. rigidula (c, h, o, p) e Manihot pentaphylla subsp. tenuifolia (d, i). Visão geral do formato das células epidérmicas comuns da face adaxial (a-d). e, fenda na epideme (c). f-i, note que as células epidérmicas da nervura cnetral são retangulares a quadradas com paredes celulares anticlinais espessadas. Na face adaxial, os estômatos se distribuem por todo o limbo foliar (a, d, f, i). g, h, note que os estômatos se localizam nas proximidades da nervura central (nc). Estômato anomocítico (**j**, **k**), paracítico (**l**) e anisocítico (**m**). Face abaxial com células epidérmicas comuns (n) e células papilosas (o). p, detalhe da nervura central da face abaxial. es, estrias; ns, nervura secundária. Barra = 100  $\mu$ m em **a**-**d**; 500  $\mu$ m em **f**-**i**; 50  $\mu$ m em **e**, **j**-**m**......49 Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura da face abaxial da lâmina foliar de Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (a, e), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (b, f), Manihot *pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**, **h**). Face abaxial com células epidérmicas comuns (**a**). Presença de células papilosas; nota-se que os estômatos estão abaixo do nível das demais células (**b-d**). Cera epicuticular em forma de crosta (**e**), plaquetas membranosas (**f**, **g**) e plaquetas irregulares (**h**). es, estrias. Barra = 50  $\mu$ m em **a-d**; 2  $\mu$ m em **e-h**.

#### ARTIGO 2

midrib, angular collenchyma on the adaxial surface, a main vascular bundle (Fp) and an accessory vascular bundle (circle). K, L, abaxial epidermis of leaf with papillose cells and dorsiventral mesophyll. M, arched leaf wing. N, flat leaf wing. O, medullary parenchyma of the stem formed by two cell types. P, medullary parenchyma of the stem formed by one cell type. Palisade parenchyma (PP); spongy parenchyma (PE); medulla (M). Scale bars: 500 µm (A, B, C, E, G–J); 100 μm (C1, D, E1, F, K, L); 1000 μm (M–P).....68 Figure 4. Manihot pentaphylla. A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, pistillate bract. I, pistillate bracteole. J, pistillate bud. K, pistillate flower. L, fruit. M, Figure 5. Manihot pentaphylla. A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, side view. F, pistillate flower. G, fruit. H, seeds. I, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax Figure 6. Map showing the geographical distribution of *Manihot pentaphylla*......71 Figure 7. Manihot rigidula. A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, stamen. I, pistillate bract. J, pistillate bracteole. K, pistillate bud. L, pistillate flower. M, fruit. N, Figure 8. Manihot rigidula. A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, side view. F, pistillate flower. G, fruit. H, seeds. I, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax pattern. J, Figure 9. Map showing the geographical distribution of *Manihot rigidula*......74 Figure 10. Manihot tenuifolia. A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, pistillate bract. I, pistillate bracteole. J, pistillate bud. K, pistillate flower. L, pistillate flower with Figure 11. Manihot tenuifolia. A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, front view. F, pistillate flower, side view. G, pistillate flower, front view. H, fruit. I, seed. J, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax pattern. J, habitat. Scale bar =  $5 \mu m$ . Photographs 

xii

#### RESUMO

Manihot Mill pertence à Euphorbiaceae Juss. com mais de 100 espécies neotropicais, sendo 65 reportadas para o Cerrado brasileiro. O gênero apresenta uma taxonomia complexa, ainda pouco estudada, com táxons diferenciados por caracteres sutis, constituindo assim, complexos de difícil delimitação. Um desses complexos é representado por Manihot pentaphylla, uma espécie que atualmente circunscreve quatro subespécies: M. pentaphylla subsp. pentaphylla; M. pentaphylla subsp. tenuifolia; M. pentaphylla subsp. rigidula e M. pentaphylla subsp. graminifolia. Estas foram descritas anteriormente como espécies distintas e posteriormente inseridas ao nível de subespécie, no entanto, estes táxons, além de crescerem em um bioma que tem sua flora pouco conhecida e que sofre constante devastação, apresentam diferenças em caracteres morfológicos conservados e úteis na delimitação de táxons no gênero, tais como: hábito e orientação de crescimento, conformação das brácteas e bractéolas e inflorescência, o que significa que o conhecimento dessas espécies se faz necessário. Uma vez que os estudos anatômicos têm fornecido informações úteis na delimitação taxonômica de espécies, este estudo teve por objetivo fornecer dados anatômicos caulinares e foliares do complexo M. pentaphylla para subsidiar a delimitação de suas categorias infraespecíficas, e apresentar uma abordagem morfológica, onde os táxons são descritos e relacionados. Para tanto, foram realizadas coletas botânicas e descrições morfológicas dos táxons, análise anatômica em microscópio óptico e em microscópio eletrônico de varredura e testes histoquímicos. Foram obtidos cortes transversais do caule e da folha dos táxons e secção longitudinais apenas do caule e do pecíolo. Os táxons exibiram significativas diferenças anatômicas de valor taxonômico como: contorno e número de feixes vasculares no pecíolo, contorno e número de feixes vasculares da nervura central, tipo de mesofilo, epiderme formada por células papilosas, distribuição e tipo de estômatos e padrão de cera epicuticular. A forma da lâmina foliar (se arqueada ou reta) e do bordo (revoluto ou não revoluto), presença de fibras gelatinosas, presença/ausência de estrias cuticulares entre outros também forneceram informações valiosas para diferenciar as espécies. Morfologicamente os táxons apresentaram diferenças quanto ao hábito, aspecto de crescimento, tipo de inflorescência, forma e integridade das brácteas e bractéolas entre outros. Por fim, com base nos caracteres morfológicos e anatômicos aqui descritos e comparados, acreditamos que os táxons estudados possuem diferenças satisfatórias para eleválos em nível de espécie.

**Palavras-chave:** Anatomia. Complexo específico. Delimitação de táxons. Euphorbiaceae. Órgãos vegetativos.

#### ABSTRACT

*Manihot* Mill belongs to Euphorbiaceae Juss. With more than 100 neotropical species, of which 65 were reported for the Brazilian Cerrado. The genus presents a complex taxonomy, still little studied, with taxa differentiated by subtle characters, constituting, therefore, complexes of difficult delimitation. One of these complexes is represented by Manihot pentaphylla Pohl, a species that currently circumscribes four subspecies: M. pentaphylla subsp. pentaphylla; M. pentaphylla subsp. tenuifolia; M. pentaphylla subsp. rigidula and M. pentaphylla subsp. graminifolia. These taxa were previously described as distinct species and later inserted at the subspecies level, however, these taxa, besides growing in a biome that has little known flora and that suffers constant devastation, present differences in morphological characters preserved and useful in the delimitation of taxa in the genus, such as: habit and growth orientation, conformation of bracts and bractolas and inflorescence, which means that knowledge of these species becomes necessary. Since anatomical studies have provided useful information on the taxonomic delimitation of species, the objective of this study was to provide anatomical data of the *M. pentaphylla* complex to support the delimitation of its infraspecific categories, and present a morphological approach, where the taxa are described and related. For this, botanical collections and morphological descriptions of the taxa were carried out, anatomical analysis under optical microscope and scanning electron microscope and histochemical tests. Transverse sections of the stem and leaf of the longitudinal taxa and taxa were obtained only from the stem and the petiole. The taxa showed significant anatomical differences of taxonomic value such as: contour and number of vascular bundles on the petiole, contour and number of vascular bundles of the central vein, type of mesophyll, epidermis formed by papillary cells, distribution and type of stomata and epicuticular wax pattern. The shape of the leaf blade (whether arched or straight) and the edge (revolute or non-revolute), presence of gelatinous fibers, presence/absence of cuticular streaks among others also provided valuable information to differentiate species. Morphologically, the taxa showed differences in habit and appearance, type of inflorescence, shape and integrity of bracts and bractoles, among others. Finally, based on the morphological and anatomical characters described and compared here, we believe that the studied taxa have satisfactory differences to raise them at the species level.

Keywords: Anatomy. Specific Complex. Delimiting taxa. Euphorbiaceae. Vegetative organs.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

Euphorbiaceae Juss. é uma das famílias mais diversificadas de angiospermas, com 222 gêneros e 6100 espécies distribuídas ao redor do mundo (JUDD *et al.* 2009), sendo representada no Brasil por 949 espécies inseridas em 64 gêneros, ocorrendo em todos os biomas (CORDEIRO *et al.* 2015). Compreende quatro subfamílias: Acalyphoideae Asch., Euphorbioideae L., Cheilosoideae (Müll. Arg.) K. Wurdack & Petra Hoffm e Crotonoideae Pax (WURDACK *et al.* 2005) e reúne plantas reconhecidas principalmente pelas folhas simples e alternas, latescentes, com flores unissexuais e frutos capsulares com sementes carunculadas (WEBSTER 1994).

A família destaca-se pela importância econômica, como visto na seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.), na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e na mamona (*Ricinus communis* L.), em espécies ornamentais como bico-de-papagaio (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotz.), coroa-de-cristo (*Euphorbia millii* Des Moulins) e cróton (*Codiaeum variegatum* L.) (SETH 2003; SOUZA & LORENZI 2008).

Devido à diversidade e à plasticidade fenotípica de muitos de seus táxons, a família tem sido negligenciada em estudos taxonômicos, sendo muito comum suas coleções estar sem identificação ou erroneamente determinadas em herbários (LUCENA 2009; SECCO *et al.* 2012).

Entre as subfamílias de Euphorbiaceae, destaca-se Crotonoideae, que reúne 2400 espécies agrupadas em 67 gêneros (WEBSTER 1994), dentre os quais se destacam *Croton* L. e *Manihot* Mill pela difícil e intrigante taxonomia.

*Manihot* inclui mais de 100 espécies neotropicais, a maioria (ca. 80) presente no Brasil e, particularmente, no Cerrado para onde são reportadas 65 espécies (SILVA *et al.* 2016b). O gênero foi descrito por Miller (1754), mas revisado pormenorizadamente mais de dois séculos depois por Rogers & Appan (1973) que reconheceram 98 espécies, uma das quais, *M. esculenta* que é a única cultivada comercialmente para alimentação e reconhecida como a mais importante fonte de amido nas regiões tropicais (JOLY & LEITÃO FILHO 1979).

*Manihot* é um gênero monofilético, possui taxonomia complexa, ainda pouco estudada, com táxons que hibridizam naturalmente e consequentemente apresenta muita sobreposição em suas morfologias, o que dificulta suas identidades e o torna promissor para estudos botânicos (ROGERS & APPAN 1973; DUPUTIÉ *et al.* 2011; CARMO JUNIOR *et al.* 2013; SILVA & SODRÉ 2014). Apesar disto, o gênero é facilmente reconhecido pela presença de látex, folhas usualmente lobadas, flores monoclamídeas, as estaminadas com 10 estames em duas classes de altura, as pistiladas com ramos estigmáticos ornamentados, além de frutos capsulares, costados ou não e sementes carunculadas (CARMO JÚNIOR *et al.* 2013; SILVA & SODRÉ 2014).

Dados obtidos a partir da anatomia de órgãos vegetativos têm sido utilizados para elucidar as relações taxonômicas em plantas (ALVES *et al.* 2002; GOMES *et al.* 2005; RIO *et al.* 2005; GOMES *et al.* 2009; PELEGRIN *et al.* 2009; HEFLER & LONGHI-WAGNER 2010; FRANCINO *et al.* 2015). Entretanto, em Euphorbiaceae, a anatomia como subsídio à taxonomia tem sido pouco explorada (SECCO 2012), mesmo assim tem se mostrado útil na delimitação de táxons como revela os trabalhos de Lucena & Sales (2006), Sá-Haiad *et al.* (2009) e Cunha Neto *et al.* (2014).

Se estudos anatômicos em Euphorbiaceae são escassos, este agrave é maior ainda em *Manihot*, onde poucos trabalhos considerando tal estudo foram realizados para espécies cultivadas (NASSAR *et al.* 2008; GRACIANO-RIBEIRO *et al.* 2009; NASSAR *et al.* 2010a), e para espécies nativas (VANNUCCI 1982; MENDONÇA 1992; CUNHA NETO *et al.* 2014; GRACIANO-RIBEIRO *et al.* 2016; SILVA *et al.* 2016a, 2010b). Entretanto, estes estudos têm revelado que a anatomia é importante na caracterização e delimitação de espécies no gênero.

Em *Maniho*t, conforme acima exposto, há espécies de difícil delimitação, com infracategorias (variedades e subespécies) que ora são diferenciadas por caracteres sutis, ora mostram-se mais diferentes entre si do que determinadas espécies do gênero, constituindo assim, complexos interessantes de serem elucidados.

Um desses complexos é representado por *Manihot pentaphylla* Pohl, uma espécie que atualmente circunscreve quatro subespécies (*M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Chodat & Hassl.) Rogers & Appan; *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* Pohl; *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Müll. Arg.) Rogers & Appan e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Pohl) Rogers & Appan), diferenciadas pelo hábito, largura dos lobos foliares, comprimento do pecíolo e inflorescência entre outros. Estas subespécies foram anteriormente descritas como espécies distintas (POHL 1827; MULLER 1874; CHODAT & HASSLER 1905) e com distribuição principal no Brasil (Região Centro-Oeste) com exceção de *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, que parece restrita ao Paraguai.

Diante desta análise, o complexo *M. pentaphylla* é aqui contemplado para estudos anatômicos, uma vez que, estes últimos têm se mostrado úteis na delimitação de espécies no gênero propiciando uma classificação taxonômica mais segura. Segue-se também uma abordagem morfológica, onde os táxons são descritos e relacionados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1. Estudos anatômicos em Manihot

#### 2.1.1. Caule

Um dos primeiros estudos anatômicos para *Manihot* foi realizado por Vannucci (1982), o qual analisou a anatomia dos órgãos vegetativos de duas espécies nativas, sendo *Manihot caerulescens* Pohl, espécie de cerrado, e *Manihot pilosa* Pohl, uma espécie de mata. Ambas apresentaram contorno circular, epiderme unisseriada, periderme, parênquima cortical externo, colênquima angular, parênquima cortical interno (quatro camadas de células), sendo a última camada diferenciada em bainha amilífera, esclerênquima formando um anel em volta do floema e xilema interno ao floema e externo à medula. *M. caerulescens* apresentou cutícula espessa, depressões na epiderme e células com conteúdo tanoide e cristais em maior quantidade no córtex, já *M. pilosa*, apresentou cutícula delgada, tricomas tectores unicelulares e ausência de depressões na epiderme.

Nassar *et al.* (2008) analisaram o efeito da poliploidia na anatomia caulinar de *M. esculenta* e o seu significado para a tolerância à seca. Foram obtidos cortes transversais da região mediana do entrenó de plantas diploides e tetraploides. Ambos apresentaram caule circular, epiderme interrompida pela periderme com presença de lenticelas, parênquima cortical externo com drusas, cristais prismáticos e laticíferos, colênquima angular (cinco camadas), parênquima cortical interno com cristais e amido formando a bainha amilífera, externamente ao floema ocorrência de fibras pericíclicas formando um anel. Constataram no tipo tetraploide características que sugerem ser este mais resistente à seca como: maior quantidade de cristais no parênquima cortical, fibras do periciclo com paredes mais espessas e xilema secundário mais desenvolvido.

Graciano-Ribeiro *et al.* (2009) realizaram estudo comparativo da anatomia caulinar de híbridos diploides e tetraploides entre *M. esculenta* e *Manihot oligantha* Pax & K. Hoffm. Os autores constataram a mesma estrutura anatômica observadas por Vannucci (1982) e Nassar *et al.* (2008), no entanto, para os híbridos foram descritos feixes vasculares bicolaterais, estrutura que segundo os autores está intimamente associada a resistência à seca e que para o gênero, este é o primeiro relato de floema interno.

Os laticíferos, na maioria das vezes, estão associados ao floema, podendo ser encontrados em outros tecidos vegetais. Nassar *et al.* (2010a), observaram laticíferos articulados apenas no floema dos híbridos entre *M. esculenta* e *M. oligantha*, bem como em *M. glaziovii* Müll. Arg. (Nassar *et al.* 2010b); já Vannucci (1982), citou laticíferos no parênquima cortical externo e

interno, floema e na medula de *M. caerulescens* e apenas no parênquima cortical interno, floema e na medula de *M. pilosa*.

Nassar *et al.* (2010b), estudaram a anatomia caulinar de *M. glaziovii* e observaram que esta espécie apresenta formato circular em vista frontal, epiderme unisseriada, abundantes cristais no parênquima cortical (parênquima cortical externo, colênquima e parênquima cortical interno), bainha amilífera, fibras gelatinosas com parede celular espessada e tilos nos elementos de vaso.

Nos estudos realizados por Nassar *et al.* (2008; 2010a, 2010b) e Graciano-Ribeiro & Nassar (2012) com híbridos entre *M. esculenta* e espécies selvagens, percebe-se que fibras do periciclo com parede mais espessa e tecido vascular com maior diâmetro está intimamente relacionado a resistência à seca.

França *et al.* (2010) e Nassar *et al.* (2010b), observaram fibras gelatinosas no caule de *M. glaziovii* e leve grau de lignificação na medula. Fibras libriformes formando um anel externamente ao floema e interrompidas por células com conteúdo tanoide foram observadas em *M. caerulescens*; em *M. pilosa*, conteúdo tanoide não foi constatado neste tecido (Vannucci 1982). Ainda em *M. caerulescens*, o parênquima medular apresentou células com paredes lignificadas e não lignificadas, e apenas parênquima medular com paredes não lignificadas em *M. pilosa*.

A estrutura básica da anatomia interna do caule é semelhante entre as espécies do gênero, podendo ocorrer pequenas variações quanto à espessura da cutícula, presença de depressões na epiderme, tricomas, distribuição de idioblatos secretores e desenvolvimento do esclerênquima. Percebe-se que estas características, embora sutis, estão intimamente relacionadas a adaptação da planta ao ambiente em que vive.

Silva *et al.* (2016a), descreveram pela primeira vez a anatomia de *Manihot pachycaulis* M. J. Silva; em seus estudos, notaram que o caule, na porção distal era mais estreito, e na porção basal, mais largo. Anatomicamente, ambas regiões apresentaram contorno circular, epiderme uniestratificada cobertas por cutícula espessa e compostos fenólicos em seu interior, córtex composto por colênquima subepidérmico e parênquima interno, feixe vascular colateral e laticíferos no floema. A região distal apresentou periciclo formado por fibras gelatinosas e medula com parênquima isodiamétrico, já a região basal, apresentou uma medula formada por parênquima aquífero.

Na Tabela 1 estão listados os caracteres anatômicos do caule que são comuns e diagnósticas entre os táxons de *Manihot* aqui citados.

#### 2.1.2. Lâmina foliar

Vannucci (1982) observou estruturas anatômicas semelhantes na lâmina foliar de *M. caerulescens* e *M. pilosa* como: nervura central com contorno biconvexo, epiderme unisseriada, anfiestomática, estômatos paracíticos, epiderme abaxial papilosa, mesofilo dorsiventral, feixes vasculares colaterais, nervura cnetral com dois feixes vasculares (um maior principal e outro menor acessório), colênquima angular em ambas as faces e idioblastos secretores e cristalíferos; laticíferos também foram observados no mesofilo e no floema da nervura central. *M. caerulescens*, não apresentou tricomas e a epiderme exibiu cutícula espessa, enquanto que *M. pilosa* revelou tricomas em ambas as faces e cutícula delgada. Fibras esclerenquimáticas mais espessadas foram observadas na região do floema de *M. caerulescens*.

Ueno e Agarie (1997) analisaram a estrutura anatômica da folha de *M. esculenta* e descreveram as mesmas estruturas básicas relatadas para as espécies estudadas por Vannucci (1982), sendo: epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral e epiderme abaxial papilhosa. Cerqueira (1992) analisou quatro cultivares de mandioca (*M. esculenta*) e observou que estes eram anfiestomáticos e que a densidade de estômatos na epiderme adaxial era menor que na epiderme abaxial e localizavam-se próximos à nervura central adaxial.

Estrutura "girder" (extensão de células da bainha em direção à epiderme) na lâmina foliar de *M. glaziovii* foi citada por França *et al.* (2010) como sendo um caráter de valor taxonômico. Ainda neste trabalho, descreve a presença de estômatos localizados em depressões formadas pelas papilas na face abaxial, mesofilo dorsiventral com parênquima paliçádico formado por uma única camada celular e parênquima lacunoso com 4-5 camadas e idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio localizados principalmente na região da nervura central. Drusas compostas por oxalato de cálcio também foram relatadas nas espécies estudadas por Vannucci (1982).

Buscando avaliar características importantes para adaptação em diferentes condições ambientais, Ribeiro *et al.* (2012) estudaram a anatomia foliar de treze genótipos de *M. esculenta*. Em seus estudos, os genótipos apresentaram epiderme abaxial formada por papilas, sendo os estômatos localizados em depressões, assim como as espécies descritas por Vannucci (1982) e França *et al.* (2010).

Cunha Neto *et al.* (2014), realizaram estudos anatômicos para *Manihot*, visando subsidiar a taxonomia do complexo *Manihot violacea* Pohl. Todos os táxons apresentaram epiderme uniestratificada, folha anfiestomática (exceto *Manihot violacea* ssp. *Jacobinensis* (Müll. Arg.) Allen, *Manihot violacea* var. *divergens* (Pohl) Mu<sup>-</sup>Il. Arg) e *M. violácea*), estômatos do tipo paracítico, mesofilo isobilateral (dorsiventral em *M. violácea, Manihot caerulescens* Pohl e *Manihot dichotoma* var. *dichotoma* Ule), cristais do tipo drusa e idioblastos secretores encontrados na nervura central (exeto idioblastos secretores em *M. dichotoma* var. *dichotoma*), laticíferos no mesofilo e na nervura central, córtex formado por parênquima, colênquima (4-5 camadas), feixe vascular colateral formado por um arco maior e pequenos feixes acessórios.

Na descrição realizada por Cunha Neto *et al.* (2014), *M. violacea* ssp. *Jacobinensis*, *M. violácea* e *M. caerulescens* distinguem-se anatomicamente das demais espécies estudadas, apresentando epiderme abaxial formada por papilas (as demais espécies apresentaram epiderme com formato retangular ou redondo); ainda *M. violacea* ssp. *Jacobinensis* possui parênquima lacunoso com maior espaço intercelular (assim como *M. violacea*), células epidérmicas contendo drusas e células esclerenquimáticas formando uma bainha em volta do floema. Em *Manihot violacea* var. *cecropiifolia* (Pohl) Mull. Arg, M. *violacea* var. *divergens* e *M. caerulescens* a nervura central apresentou contorno bicovexo e nas demais nervura proeminente na região abaxial (Cunha Neto *et al.* 2014).

Nota-se caracteres peculiares que distinguem as espécies do gênero, como o tipo de mesofilo e o contorno da nervura central observasdos por Vannucci (1982) e Cunha Neto *et al.* (2014). Esta característica pode ser um fator importante na determinação de espécies dentro do gênero, assim como epiderme formada por papilas, presença de tricomas, estômatos em ambas as faces e estrutura "girder".

A anatomia da lâmina foliar de *Manihot allemii* M. J. Silva foi descrita por Silva *et al.* (2016b). Esta espécie exibiu epiderme unisseriada com células epidérmicas comuns da face adaxial com formato retangular cobertas por cutícula espessa, estômatos em ambas as faces, sendo mais frequentes na face abaxial abaixo do nível das células papilosas, mesofilo isobilateral; o parênquima do mesofilo interrompido na nervura central por colênquima lacunar em ambas as faces; ala foliar com feixes vasculares colaterais rodeados por bainha parenquimática e feixe vascular bicolateral na nervura central.

Na Tabela 2 estão listados os caracteres anatômicos da lâmina foliar que são comuns e diagnósticas entre os táxons de *Manihot* aqui citados.

#### 2.1.3. Pecíolo

Nos estudos realizados por Vannucci (1982), o pecíolo de *M. caerulescens* e *M. pilosa* em seção transversal apresentou a seguinte organização: contorno circular, epiderme unisseriada, parênquima cortical externo com mais ou menos quatro camadas, colênquima angular, parênquima cortical interno com grãos de amido na camada mais interna, esclerênquima formando um anel na periferia do floema e feixe vascular colateral em número de cinco a sete. Em *M. caerulescens*, o parênquima medular apresentou células com paredes lignificadas e não lignificadas, e apenas

parênquima medular com paredes não lignificadas em *M. pilosa*. Os laticíferos foram observados em três locais: no parênquima cortical externo próximo ao colênquima, na região floemática e na região perimedular. Na espécie de cerrado (*M. caerulescens*), a epiderme apresentou cutícula espessa, e na espécie de mata (*M. pilosa*), cutícula delgada, esclerênquima pouco diferenciado e tricomas (Vannucci 1982).

Células esclerenquimáticas formando um anel contínuo na periferia do floema, como observado nas espécies estudadas por Vannucci (1982) e Cunha Neto *et al.* (2014) é uma característica muito comum e vantajosa para plantas que crescem em solo com pouca retenção de água, protegendo os feixes e evitando a perda de água (Boeger & Wisniewski 2003).

Os táxons estudos por Cunha Neto *et al.* (2014) exibiram em comum contorno circular (achatado em *M. violacea* ssp. *Jacobinensis*), epiderme unisseriada revestida por cutícula espessa, córtex composto por colênquima subepidérmico e parênquima interno (parênquima subepidérmico e colênquima interno em *M. violacea* var. *cecropiifolia*) e feixe vascular colateral.

Dois tipos de idioblastos foram encontrados nas espécies estudadas por Cunha Neto *et al.* (2014): idioblastos secretores com conteúdo denso corado com safranina e idioblastos cristalíferos com drusas, bem como nas espécies estudadas por Vannucci (1982).

Nos estudos reslizados por Cunha Neto *et al.* (2014) os idioblastos foram observados em células epidérmicas (apenas drusas), região cortical, próximo aos feixes vasculares e na medula. O padrão de distribuição de idioblastos secretores nos estudos de Cunha Neto *et al.* contribuiu para a distinção de espécies dentro do gênero, além disso, nos estudos de Vannucci (1982) a espécie de cerrado apresentou maior quantidade de idioblasto tanífero e cristalífero do que a espécie de mata. Sabe-se que taninos em tecidos vegetais estão intimamente relacionados com a interação entre plantas e animais, além de manter a integridade dos tecidos de plantas sob estresse hídrico.

Um caráter importante de valor taxonômico identificado por Cunha Neto *et al.* (2014) foi a variação no número de feixes vasculares entre as espécies estudadas, sendo *M. violacea* ssp. j*acobinensis* com cinco e dez feixes vasculares, *M. violacea* var. *cecropiifolia* com dez, *M. violácea* com sete e *M. violacea* var. *divergens* com seis feixes.

Em Euphorbiaceae, a presença de laticíferos é um caráter comumente observado (Rudall 1987). Laticíferos não articulados foram identificados em espécies descritas por Cunha Neto *et al.* (2014).

Nas descrições realizadas por Graciano-Ribeiro *et al.* (2016) *Manihot fortalezensis* Nassar, Ribeiro, Bomfim & Gomes, *Manihot pohlii* Wawra e *Manihot pseudoglaziovii* Pax & K.Hoffm. exibiram em secção transversal formato circular, estelo do tipo sifonostelo ectofloico, epiderme uniestratificada com parede celular espessa e coberta por cutícula lisa e espessada; córtex formado por células parenquimáticas subepidérmicas, colênquima angular, parênquima interno e uma bainha de amido; periciclo formado por fibras gelatinosas; feixes vasculares colaterais que variaram em número entre as espécies, sendo seis em *M. pohlii*, sete em *M. caerulescens*, oito em *M. pseudoglaziovii*, dez em *M. fortalezensis*; o parênquima medular variou entre as espécies, apresentando células com paredes delgadas e células com paredes espessadas e lignificadas. Ainda em seus estudos, observaram idioblastos secretores e cristalíferos em diferentes regiões do pecíolo.

No estudo de Silva *et al.* (2016b) o pecíolo de *M. allemii* em secção transversal exibiu contorno circular, epiderme uniestratificada com cutícula espessa, córtex formado por parênquima subepidérmico, colênquima lacunar e parênquima interno que forma uma bainha em volta do cilindro vascular, este último exibiu fibras pericíclicas formando um anel entre os feixes colaterais que variaram em número de cinco a seis.

Na Tabela 3 estão listados os caracteres anatômicos do pecíolo que são comuns e diagnósticas entre os táxons de *Manihot* aqui citados.

# 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES MV, ESTELITA MEM, WANDERLEY MGL & THOMAS WW. 2002. Aplicações taxonômicas da anatomia foliar de espécies brasileiras de *Hypolytrum* Rich. (Cyperaceae). *Revista Brasil Botânica* 25: 1–9.
- BOEGER MR & WISNIEWSKI C. 2003. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. *Revista Brasil Botânica* 26: 61–72.
- CARMO JÚNIOR JE, SILVA MJ, SALES MF & SODRÉ RC. 2013. *Manihot* (Euphorbiaceae s.s.) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia* 64: 727–746.
- CERQUEIRA YM. 1992. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I Densidade estomática. *Sitientibus* 10: 103–115.
- CHODAT R & HASSLER E. 1905. Plantae Hasslerianae, soit énumération des plantes recoltées au Paraguay. Bulletin de l'Herbier Boissier 2,5: 1–1250. [online] http://w ww.biodiversitylibrary.org/item/104932#page/1336/mode/1up [Acesso em 10 fevereiro de 2017].
- CORDEIRO I, SECCO R, CARDIEL JM, STEINMANN V, CARUZO MBR, RIINA R, LIMA LR, MAYA LCA, BERRY P, CARNEIRO-TORRES DS, SILVA OLM, SALES MF, SILVA MJ, SODRÉ RC, MARTINS MLL, PSCHEIDT AC, ATHIÊ-SOUZA SM, MELO AL, OLIVEIRA LSD, PAULA-SOUZA J & SILVA RAP. 2015. Euphorbiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico doRio de Janeiro. [online] http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113 [Acesso em 01 de março de 2017].
- CUNHA NETO IL, MARTINS FM, CAIAFA AN & MARTINS MLL. 2014. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in *Quinquelobae* section (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 37: 481–494.
- DUPUTIÉ A, SALICK J & MCKEY D. 2011. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography* 38: 1033–1043.
- FRANÇA AA, GUIM A, BATISTA AMV, PIMENTEL RMM, FERREIRA GDG & MARTINS IDSL. 2010. Anatomia e cinética de degradação do feno de *Manihot glaziovii*. Acta Scientiarum Animal Sciences 32: 131–138.
- FRANCINO DMT, COUTINHO IAC, DALVI VC, AZEVEDO AA, CONCEIÇÃO AS & MEIRA RMSA. 2015. Anatomical interpretations of the taxonomy of Chamaecrista (L.)

Moench sect. Absus (Leguminosae–Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 2087–2103.

- GOMES SM, SOMAVILLA NSDN, GOMES-BEZERRA KM, MIRANDA SC, DE-CARVALHO OS & GRACIANO-RIBEIRO D. 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. Acta Botanica Brasilica 23: 223–238.
- GOMES SMA, ELDO SILVA AM, LOMBARDI JA, AZEVEDO AA & VALE FHA. 2005. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no Sudeste do Brasil. Acta Botanica Brasilica 19: 945–961.
- GRACIANO-RIBEIRO D & NASSAR NMA. 2012. Comparative anatomical study in cassava diploid and tetraploid hybrids. *Plant Systematics Evolution* 298: 1711–1721.
- GRACIANO-RIBEIRO D, HASHIMOTO DYC, NOGUEIRA LC, TEODORO D, MIRANDA SF & NASSAR NMA. 2009. Internal phloem in an interspecific hybrid of cassava, an indicator of breeding value for drought resistance. Genetics and molecular research 8: 1139–1146.
- GRACIANO-RIBEIRO D, HASHIMOTO-FREITAS DY & NASSAR NMA. 2016. Comparative petiole anatomy of cassava (*Manihot*) species. Genetics and molecular research 15: 1–13.
- HEFLER SM & LONGHI-WAGNER HM. 2010. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. Acta Botanica Brasilica 24: 708–717.
- JOLY AB & LEITÃO FILHO HF. 1979. **Botânica Econômica: as principais culturas brasileiras**. Editora da Universidade de São Paulo.
- JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOGG EA, STEVENS PF & DONOGHUE MJ. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. Editora Artmed.
- LUCENA MFA & SALES MF. 2006. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae). *Rodriguésia* 57: 11–25.
- LUCENA MFA. 2009. **Diversidade de Euphorbiaceae** (*s. l*) **no Nordeste do Brasil**. 197 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco - Recife.
- MENDONÇA MS. 1992. Estudo de plantas laticíferas II. Aspectos anatômicos e distribuição de vasos laticíferos em *Manihot glaziovii* Muller Arg. *Acta Amazônica* 22: 309–321.
- MILLER P. 1754. The Gardeners Dictionary, 4th Ed. 12. Vol. II. London.
- MÜLLER AJ. 1874. Flora Brasiliensis. Missouri Botanical garden 11: 1–752. [online] http://www.biodiversitylib rary.org/page/145029#page/3/mode/1up [Accessed 10 February 2017].

- NASSAR NMA, GRACIANO-RIBEIRO D, FERNANDES SDC & ARAUJO PC. 2008. Anatomical alterations due to polyploidy in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. *Genetics and Molecular Research* 7: 276–283.
- NASSAR NMA, HASHIMOTO DY & GRACIANO-RIBEIRO D. 2010a. Genetic, embryonic and anatomical study of an interspecific cassava hybrid. *Genetics and Molecular Research* 9: 532–538.
- NASSAR NMA, ABREU LFA, TEODORO DAP & GRACIANO-RIBEIRO D. 2010b. Drought tolerant stem anatomy characteristics in *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) and a wild relative. *Genetics and molecular research* 9: 1023–1031.
- PELEGRIN CMG, LONGHI-WAGNER HM & OLIVEIRA PL. 2009. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de espécies do Complexo *Briza* L. (Poaceae: Pooideae: Poeae). *Acta Botanica Brasilica* 23: 666–680.
- POHL JE. 1827. Plantarum brasiliae icones et descriptiones. 1: 1–152. [online] http://www.b iodiversitylibrary.org/page/276186#page/8/mode/1up [Accessed 10 February 2017].
- RIAÑO N, COCK JH & LOPES FY. 1987. Características fotossintéticas de la yuca Manihot esculenta Crantz. Anatomia foliar, ultraestructura de cloroplastos, tasas fatosintéticas y productos iniciales de la fijacion del CO<sub>2</sub> con <sup>14</sup>C. Acta Agronómica 37: 7–17.
- RIBEIRO MNO, CARVALHO SP, PEREIRA FJ & CASTRO EM. 2012. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. *Revista Ciência Agronômica* 43: 354–361.
- RIO MCS, KINOSHITA LS & CASTRO MM. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. *Revista Brasil Botânica* 28: 713–726.
- ROGERS DJ & APPAN SG. 1973. *Manihot* and Manihotoides (Euphorbiaceae). *Flora Neotropica* 13: 1–272.
- SÁ-HAIAD B, SERPA-RIBEIRO ACC, BARBOSA CN, PIZZINI D, LEAL DO, SENNA-VALLE L & SANTIAGO-FERNANDES LDR. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s. s., Malpighiales). *Plant Systematics and Evolution* 283: 179–202.
- SECCO RDS, CORDEIRO I, SENNA-VALE LD, SALES MFD, LIMA LRD, MEDEIROS D, SÁ HAIAD B, OLIVEIRA AS, CARUZO MBR, CARNEIRO-TORRES D & BIGIO NC. 2012. An overview of recent taxonomic studies on Euphorbiaceae s. l. in Brazil. Panorama dos recentes estudos taxonômicos em Euphorbiaceae s. l. no Brasil. Rodriguésia 63: 227–242.

SETH MK. 2003. Trees and their economic importance. The Botanical Review 69: 321-376.

- SILVA MJ & SODRÉ RC. 2014. A dwarf species of *Manihot* Mill (Euphorbiaceae s. s.) from the highlands of Goiás, Brazil. *Systematic Botany* 39: 222–226.
- SILVA MJ, ALONSO AA & SODRÉ RC. 2016a. *Manihot pachycaulis* sp. (Euphorbiaceae) from the Brazilian Cerrado. *Nordic Journal of Botany* 34: 60–65.
- SILVA MJ, INOCENCIO LS & ALONSO AA. 2016b. Manihot allemii sp. nov. (Euphorbiaceae s.s.) with entire and unlobed leaves from northern Brazil, with notes about foliar anatomy. Nordic Journal of Botany 34: 134–140.
- SOUZA VC & LORENZI H. 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. Editora Plantarum.
- UENO O & AGARIE S. 1997. The intercelular distribution of glycine decarboxylase in leaves of cassava in relation to the photosynthetic mode and leaf anatomy. *Japanese Journal of Crop Science* 66: 268–278.
- VANNUCCI AL. 1982. Anatomia comparada de duas espécies nativas de Monihot Mill (Euphorbiaceae Juss). 151 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de Campinas - Campinas.
- WEBSTER GL. 1994. Sistematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 33–144.
- WURDACK KJ, HOFFMANN P & CHASE A. 2005. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcl and trnl-f dna sequences. *American Journal of Botany* 92: 1397–1420.

# TABELAS

Caráter anatômico	MC	MP	MG	MPA		
Contorno	Circular	Circualar	Circular	Circular		
Epiderme	Unisseriada,	Unisseriada	Unisseriada,	Unisseriada		
Cutícula	Espessa	Delgada	Não citado	Espessa		
Córtex	Parênquima externo, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima externo, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima externo, colênquima angular e parênquima interno	Colênquima subepidérmico e parênquima interno		
Conteúdo celular no córtex	Conteúdo tanóide e cristais	Conteúdo tanóide e cristais	Cristais	Não citado		
Fribras gelatinosas	Ausente	Ausente	Presentes	Presente		
Feixe vascular	Colateral	Colateral	Não citado	Colateral		
Laticíferos	Parênquima cortical externo e interno, floema e medula	Parênquima cortical externo, floema e medula	Floema	Floema		
Medula	Parênquima medular com paredes celulares lignificadas e não lignificadas	Parênquima medular com paredes celulares não lignificadas	Parênquima medular com paredes celulares lignificadas e não lignificadas	Parênquima medular e aquífero		

Tabela 1. Caracteres anatômicos do caule de táxons de Manihot estudados anteriormente

Manihot caerulescens Pohl (MC); Manihot pilosa Pohl (MP); Manihot glaziovii Müll. Arg. (MG). Manihot pachycaulis M. J. Silva (MPA).

Caráter anatômico	MC	MP	MVJ	MVD	MV	MDD	MVC	MA	ME	MG
Contorno da nervura central	Biconvexo	Biconvexo	Proeminente na região abaxial	Biconvexo	Proeminente na região abaxial	Proeminente na região abaxial	Biconvexo	Não citado	Não citado	Não citado
Epiderme	Unisseriada com cutícula espessa	Unisseriada com tricomas e cutícula delgada	Unisseriada	Unisseriada	Unisseriada	Unisseriada	Unisseriada	Unisseriada com cutícula espessa	Unisseriada	Não citado
Papilas na face abaxial	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
Distribuição de estômatos	Anfiestomática	Anfiestomática	Hipoestomática	Hipoestomática	Hipoestomática	Anfiestomática	Anfiestomática	Anfiestomática	Anfiestomática	Não citado
Mesofilo	Dorsiventral	Dorsiventral	Isobilateral	Isobilateral	Dorsiventral	Dorsiventral	Isobilateral	Isobilateral	Dorsiventral	Dorsiventral
Feixe vascular	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Bicolateral/ colateral	Não citado	Não citado
Feixes vasculares acessórios	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Não citado	Não citado	Não citado
Conteúdo celular	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Não citado	Não citado	Cristais

Tabela 2. Caracteres anatômicos da lâmina foliar de táxons de Manihot estudados anteriormente

Manihot caerulescens Pohl (MC); Manihot pilosa Pohl (MP); Manihot violacea ssp. Jacobinensis (MVJ); Manihot violacea var. divergens (Pohl) Mu<sup>-</sup>ll. Arg (MVD); Manihot violacea (MV); Manihot dichotoma var. dichotoma Ule (MDD); Manihot violacea var. cecropiifolia (Pohl) Mull. Arg (MVC); Manihot allemii M. J. Silva (MA); Manihot esculenta Crantz (ME) Manihot glaziovii Müll. Arg. (MG).

Caráter anatômico	MC	MP	MVJ	MVC	MV	MVD	МРО	MPS	MF	MA
Contorno	Circular	Circular	Achatado	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular	Circular
Epiderme	Unisseriada e cutícula espessa	Unisseriada, cutícula delgada e tricomas	Unisseriada e cutícula espessa	Unisseriada e cutícula espessa	Unisseriada e cutícula espessa	Unisseriada e cutícula espessa				
Córtex	Parênquima subepidermico, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima subepidermico, colênquima angular e parênquima interno	Colênquima subepidérmico e parênquima interno	Parênquima subepidermico e colênquima interno	Colênquima subepidermico e parênquima interno	Colênquima subepidermico e parênquima interno	Parênquima subepidermico, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima subepidermico, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima subepidermico, colênquima angular e parênquima interno	Parênquima subepidérmico, colênquima lacunar e parênquima interno
Feixe vascular	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral	Colateral
Número de feixes vasculares	Cinco a sete	Cinco a sete	Cinco a dez	Dez	Sete	Seis	Seis	Oito	Dez	Cinco a seis
Conteúdo celular	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Idioblastos secretores e cristais	Não citado

Tabela 3. Caracteres anatômicos do pecíolo de táxons de Manihot estudados anteriormente

Manihot caerulescens Pohl (MC); Manihot pilosa Pohl (MP); Manihot violacea ssp. Jacobinensis (MVJ); Manihot violacea var. cecropiifolia (Pohl) Mull. Arg (MVC); Manihot violacea (MV); Manihot violacea var. divergens (Pohl) Mu'll. Arg (MVD); Manihot pohlii Wawra (MPO); Manihot pseudoglaziovii Pax & K.Hoffm (MPS); Manihot fortalezensis Nassar, Ribeiro, Bomfim & Gomes (MF), Manihot allemii M. J. Silva (MA).

### **4. RESULTADOS**

Os resultados desta dissertação serão apresentados sob a forma de artigos os quais seguem as normas dos periódicos para onde foram ou serão enviados à publicação:

Artigo 1. **Delimitação de táxons do complexo** *Manihot pentaphylla* (Euphorbiaceae) com base em anatomia caulinar e foliar. Anais da Academia Brasileira de Ciências (Qualis CAPES B2, na Área da Biodiversidade).

Artigo 2. **Delimitação de táxons do complexo** *Manihot pentaphylla* (Euphorbiaceae) com base em dados morfológicos. Botanical Journal of the Linnean Society (Qualis CAPES A2, na Área da Biodiversidade).

# **ARTIGO 1**

# Delimitação de táxons do complexo Manihot pentaphylla (Euphorbiaceae) com

base em anatomia caulinar e foliar

# A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

Anais da Academia Brasileira de Ciências

# Delimitação de táxons do complexo *Manihot pentaphylla* (Euphorbiaceae) com base em anatomia caulinar e foliar

### ELIFALETE S. AZEVEDO<sup>1</sup>, MARCOS J. DA SILVA<sup>1, 2</sup> e DALVA GRACIANO-RIBEIRO<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Av. Esperança, s/n, 74690-900 Goiânia, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Av. Esperança, s/n, 74690-900 Goiânia, GO, Brasil.

**Resumo** – *Manihot* Mill pertence à Euphorbiaceae Juss., possui mais de 100 espécies neotropicais e tem no Brasil, particularmente no Cerrado, seu centro de diversidade com 65 espécies. Este gênero possui espécies de difícil delimitação, que se diferenciam por caracteres sutis, constituindo complexos específicos como *M. pentaphylla* que atualmente circunscreve quatro subespécies. Apesar de pouco estudada, a anatomia de órgãos vegetativos tem se mostrado útil na delimitação de táxons em Manihot. Neste trabalho é apresentada a caracterização da anatomia caulinar e foliar dos táxons do complexo M. pentaphylla, sendo: M. pentaphylla subsp. graminifolia, M. pentaphylla subsp pentaphylla, M. pentaphylla subsp rigidula e M. pentaphylla subsp tenuifolia, visando levantar caracteres que melhor subsidiem suas diferenças. Para tanto, secções transversais da região mediana do caule e da folha e longitudinais do caule e pecíolo foram analisadas utilizando microscópio óptico. O padrão de cera epicuticular da epiderme abaxial também foi analisado por meio de microscopia eletrônica de varredura e testes histoquímicos foram feitos em secções transversais da lâmina foliar. Os táxons estudados apresentaram significativas diferenças de valor taxonômico como: contorno e número de feixes vasculares no pecíolo, contorno e número de feixes vasculares da nervura central, tipo de mesofilo, presença/ausência de epiderme papilosa, distribuição e tipo de estômatos e padrão de cera epicuticular.

**Palavras-chave:** Cerrado, caracterização anatômica, complexo específico, implicações taxonômicas, micromorfologia, xeromórficas.

Abstract – Manihot Mill belongs to Euphorbiaceae Juss., has more than 100 Neotropical species and has in Brazil, particularly in the Cerrado, its diversity center with 65 species. This genus has species of difficult delimitation, which are distinguished by subtle characters, constituting specific complexes such as *M. pentaphylla* that currently circumscribes four subspecies. Although not well studied, the anatomy of vegetative organs has been shown to be useful in the delineation of taxa in Manihot. In this work the characterization of the stem and leaf anatomy of the M. pentaphylla complexes is presented, being: M. pentaphylla subsp graminifolia, M. pentaphylla subsp pentaphylla, M. pentaphylla subsp rigidula and M. pentaphylla subsp tenuifolia, aiming at raising characters that best subsidize their differentiation. For this purpose, cross sections of the medial stem and leaf and longitudinal sections of stem and petiole were analyzed using an optical microscope. The epicuticular wax pattern of the abaxial epidermis was also analyzed by scanning electron microscopy and histochemical tests were done on cross sections of the leaf blade. The studied taxa showed significant differences in taxonomic value such as: contour and number of vascular bundles in the petiole, contour and number of vascular bundles of the central vein, type of mesophyll, papillose epidermis, distribution and type of stomata, and epicuticular wax pattern. Key words: Cerrado, anatomical characterization, specific complex, taxonomic implications, micromorphology, xeromorphic.

## **INTRODUÇÃO**

*Manihot* Mill pertence à Euphorbiaceae Juss., é um gênero americano (Carmo Júnior et al. 2013; Silva et al. 2016a) e tem no Brasil, particularmente no Cerrado, o seu centro de diversidade com 65 espécies (Silva et al. 2016b). Neste Bioma, as espécies deste gênero costumeiramente apresentam uma morfologia floral conservada e uma grande variedade de hábitos e aspectos de crescimento e também em sua folhagem (Rogers e Appan 1973; Duputié et al. 2011, Silva e Sodré 2014), motivo pelo qual, torna-se promissor para estudos anatômicos e taxonômicos.

Rogers e Appan (1973) estabeleceram para o gênero 19 seções, dentre elas, *Manihot* sect. *Graciles* Rogers & Appan, um táxon que abriga espécies de difícil delimitação, que se diferenciam por caracteres sutis, constituindo complexos específicos. Um desses complexos é *Manihot pentaphyla* Pohl que atualmente circunscreve as subespécies: *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Chodat e Hassl.) Rogers e Appan, *Manihot. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* Pohl, *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (Müll. Arg.) Rogers e Appan e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Pohl) Rogers & Appan, as quais foram descritas anteriormente como espécies distintas (Pohl 1827, Müller 1874, Chodat e Hassler 1905), sendo que nos estudos realizados por Rogers e Apan (1973) estas espécies estão agrupadas em infracategorias. No entanto, estes táxons em seu habitat natural se diferenciam pelo hábito e aspecto de crescimento, comprimento e largura dos lobos foliares, tipo de inflorescência e integridade das brácteas e bractéolas.

A anatomia interna dos órgãos vegetativos tem subsidiado a delimitação taxonômica de alguns grupos de plantas (Reis et al. 2005; Gomes et al. 2005; Rio et al. 2005; Oliveira et al. 2008; Gomes et al. 2009). Em *Manihot*, os estudos anatômicos têm se mostrado úteis na caracterização das estruturas internas, como revelam os realizados por Vannucci (1982), França et al. (2010), Nassar et al. (2010), Ribeiro et al. (2012), Cunha Neto et al. (2014), Graciano-Ribeiro et al. (2016) e Silva et al. (2016a, b), os quais estudaram a anatomia dos órgãos vegetativos de espécies selvagens. Para estes autores, o número de feixes vasculares no pecíolo, distribuição de idioblastos secretores, extensão de células da bainha em direção à epiderme, presença de células papilosas e tricomas, distribuição dos estômatos na folha, contorno da nervura central e tipo de mesofilo, são caracteres importantes e mostraram-se úteis na delimitação de táxons. Apesar disto, estudos anatômicos no gênero ainda são escassos se considerada sua diversidade (mais de 100 espécies).

Anatomicamente, *Manihot* apresenta: folhas usualmente anfiestomática, mesofilo dorsiventral, às vezes isobilateral, epiderme uniestratificada coberta por cutícula espessa, epiderme da face abaxial formada por papilas, podendo em alguns casos não ocorrer, nervura central com feixe vascular colateral ou bicolateral, pecíolo circular com córtex formado por parênquima
subepidérmico, colênquima angular ou lacunar e parênquima interno, periciclo com fibras gelatinosas, ainda no pecíolo, sistema vascular disposto em um círculo interrompido por feixes vasculares, os quais variam em número entre as espécies.

Levando-se em consideração a importância dos estudos anatômicos na resolução de problemas taxonômicos, o presente trabalho teve por objetivo descrever e comparar a anatomia caulinar e foliar dos táxons do complexo *M. pentaphylla* e selecionar caracteres de valor taxonômico. Além disso, realizou-se análise do padrão morfológico das ceras epicuticulares foliares, por meio da microscopia eletrônica de varredura e testes histoquímicos da lâmina foliar.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, os táxons foram coletados no estado de Goiás entre os meses de março de 2015 a maio de 2016 (com exceção de *M. pentaphylla* subsp *graminifolia*, a qual foi analisada por meio de material herborizado); sendo *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* coletada no município de Pirenópolis (Go), *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* em Caiapônia (Go) e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* em Mossâmedes (Go).

Material examinado: M. pentaphylla subsp. graminifolia. Paraguai. Distrito de Pedro
Juan Caballero, 08 março 2002 (fl., fr.), A. Schinini, M. Domatteis, R. Durê & M. Quintana 36083
(PY; CTES). M. pentaphylla subsp. pentaphylla. Brasil. Goiás: Serra dos Pireneus, 17 dezembro
2015 (fl., fr.), E. S. Azevedo & R. C. Teixeira 27 (UFG). M. pentaphylla subsp. rigidula. Brasil.
Goiás: Caiapônia, 6 dezembro 2015 (fl., fr.), E. S. Azevedo et al. 16 (UFG). M. pentaphylla subsp.
tenuifolia. Brasil. Goiás: Parque Estadual da Serra Dourada (PESD) 31 outubro 2015, (fl., fr.), E.
S. Azevedo & T. H. S. Sampaio 14 (UFG). PY, CTES, UFG (acrônimos segundo Thiers 2016).

Folhas completamente expandidas de cinco indivíduos da mesma população de cada subespécie foram analisadas. Folhas do terceiro e quarto nó do ápice para base e o entrenó da mesma região foram fixados em FAA 70% (formaldeído 37-40%, ácido acético glacial, álcool etílico 70%; 1:1:18) por 24h e armazenados em etanol 70% (Johansen 1940). As amostras de materiais de herbário foram reidratadas em série etílica e armazenadas em etanol 70% até o preparo das lâminas (Voster 1999 com adaptações).

Secções transversais da região mediana do lobo central da lâmina foliar, do pecíolo e do caule e secções longitudinais apenas do caule e pecíolo foram feitas à mão livre e posteriormente clarificadas com hipoclorito de sódio (10% e 20%) e submetidas ao corante azul de astra aquoso 0,3% e safranina aquosa 0,1% (3:1 v/v) (Johansen 1940). Os cortes foram montados entre lâmina

e lamínula utilizando resina sintética (Paiva et al. 2006). Análise anatômica do caule foi realizada em todas as subespécies, exeto *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*.

Para análise da epiderme em vista frontal, destacou-se a epiderme adaxial e abaxial por meio de solução de peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial (1:1) (Franklin 1945) e coradas com safranina aquosa 1% (Johansen 1940). As lâminas foram montadas de acordo com a metodologia de Paiva et al. (2006). A classificação dos estômatos se basearam em Metcalfe e Chalk (1979).

O padrão de cera epicuticular da face abaxial da lâmina foliar foi analisado por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Fragmentos da região mediana do lobo central de folhas expandidas foram fixados em FAA 70% por 24h e em seguida transferidos para etanol 70%. As amostras foram desidratados em série etílica crescente, submetidas ao sistema de secagem pelo ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Autosamdri®, 815 Séries A) (exceto *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, a qual foi analisada por meio de material herborizado, seguindo direto para metalização); posteriormente, montadas em suportes de alumínio (stubs) e metalizadas com ouro no Denton Vacuum, Desk V. A documentação fotográfica foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610, equipado com ESD, Thermo Scientific NSS Spectral Imaging) do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução – LABMIC/IF/UFG. O padrão de cera foi caracterizado com base na classificação e terminologia proposta por Barthlott et al. (1998).

Os testes histoquímicos foram realizados em materiais frescos de todas as subespécies, exeto *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*. Os fragmentos da região mediana do lobo central da lâmina foliar foram seccionados à mão livre e submetidos aos seguintes reagentes: lugol (Langeron 1949) para grãos de amido; sudan IV (Sass 1951) para cutina, suberina, látex e outros compostos lipofílicos; floroglucinol acidificado (Sass 1951) para elementos lignificados; cloreto férrico 10% (Johansen 1940) para compostos fenólicos. Para verificar a natureza dos cristais na lâmina foliar, utilizou-se ácido sulfúrico 10% (Howarth e Warne 1959) e ácido acético glacial (Kraus e Arduin, 1997).

As fotomicrografias das secções transversais e dissociação paradérmica foram obtidas com auxílio de microscópio óptico (Leica DM500) com câmera digital acoplada (Leica ICC50), usando a versão 1.8.1 do software EZ LAD (Leica Alemanha).

Uma chave dicotômica com os dados anatomicos foi elaborada utilizando uma matriz de presença/ausência (Tab. 1) com todos os táxons analisados.

#### RESULTADOS

O tipo de hábito e comprimento das plantas variaram entre as subespécies analisadas. *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* exibiram hábito arbustivo, sendo *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* com 50-150 cm e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* com 40-90 cm; *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* exibiram hábito subarbustivo, onde *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* exibiram hábito subarbustivo, onde *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* apresentou 40-50 cm de altura e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* até 40 cm de altura aproximadamente (Fig. 1).

## Caracteres anatômicos

#### Caule

Em secção transversal, o caule das subespécies estudadas possui contorno circulares (Fig. 2a–c), com epiderme uniestratificada, córtex formado por parênquima fundamental subepidérmico, colênquima angular e parênquima fundamental interno (Fig. 2d–f) e feixe vascular colateral (Fig. 2a–c).

A epiderme possui células epidérmicas comuns retangulares a circulares, com paredes celulares delgadas revestidas externamente por cutícula espessa e lisa (Fig. 2d–f). Estômatos foram observados apenas em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, estes são raros e ocorrem no mesmo nível das células epidérmicas comuns (Fig. 2d1).

O parênquima fundamental subepidérmico é composto por duas a três camadas de células isodiamétricas, de tamanho variado e parede celular levemente espessada; *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* apresentou de três a quatro camadas (Fig. 2d–f). Idioblastos secretores ocorrem nesta região, exceto em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*. Laticíferos se distribuem entre o tecido e exibem parede celular mais espessa que as demais células. Em secção longitudinal, foi possível observar que estes são articulados anastomosado (Fig. 2g).

O colênquima angular é composto por duas a três camadas de células que formam um anel contínuo entre o parênquima subepidérmico e o parênquima de preenchimento externo ao periciclo, *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* exibiu três a quatro camadas (Fig. 2d–f). Em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* o colênquima encontra-se colapsado.

O parênquima fundamental interno exibe células isodiamétricas, com tamanho variado e parede celular com espessura menor que as células do parênquima subepidérmico (Fig. 2d–f); *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* apresentaram duas a três camadas

celulares e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* uma a duas. Idioblastos secretores ocorrem nesta região (Fig. 2e–f), exceto em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (Fig. 2d). Idioblastos cristalíferos foram observados apenas em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula*. As células da camada mais interna, em contato com as fibras do periciclo, são maiores e apresentam grãos de amido, configurando a bainha amilífera.

O periciclo é composto por duas a três camadas de fibras com formato pentagonal e que forma um anel contínuo em volta dos feixes vasculares; suas células exibem tamanho variado e parede celular com diferentes espessuras (Fig. 2d–f). Em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula*, o espessamento da parede celular é maior e o lume celular é reduzido; fibras gelatinosas também ocorrem nesta região (Fig. 2e1).

O floema primário é de difícil observação; o floema secundário exibiu elementos de tubo crivado, células companheiras, parênquima floemático e laticíferos (Fig. 2d–f). Os laticíferos em secção longitudinais são articulados anastomosados, semelhantes aos observados no parênquima subepidérmico.

O câmbio vascular está completamente diferenciado, formando um anel entre o floema e xilema. A zona cambial apresenta quatro a seis camadas de células retangulares, com paredes finas e sem espaços intercelulares (Fig. 2d–f). O xilema primário está organizado em proto e mataxilema (Fig. 2d–f); o xilema secundário exibiu elementos de vaso, fibras e parênquima xilemático (Fig. 2d–f). *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* exibiu crescimento secundário menos acentuado que as demais subespécies (Fig. 2c).

A medula é formada por células parenquimáticas, com formato isodiamétrico, de tamanho variado e pequenos espaços intercelulares (Fig. 2a–c). As células próximas ao xilema são menores e grãos de amido ocorrem nesta região. Idioblastos secretores ocorrem em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*. Observa-se dois padrões celulares na medula de *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, onde as células próximas aos elementos de vaso são menores e possuem parede celular delgada e as células do centro são maiores e apresentam parede celular ligeiramente espessada (Fig. 2a).

## Pecíolo

Em secção transversal, o pecíolo exibiu contorno côncavo-convexo em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 3a) e circular em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Fig. 3b–d). A epiderme é uniestratificada, composta por células epidérmicas comuns retangulares a circulares e revestidas por cutícula

espessa e lisa; as paredes periclinais são levemente convexas e anticlinais retas (Fig. 4a–d); em *M*. *pentaphylla* subsp. *graminifolia* as paredes celulares periclinais e anticlinais são espessadas.

O córtex em todas as subespécies é constituído pelo parênquima fundamental subepidérmico, colênquima angular e parênquima fundamental interno (Fig. 4a–d). O parênquima fundamental subepidérmico é formado por duas a três camadas de células isodiamétricas, com paredes delgadas e tamanho variado, *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* e xibiram uma a duas camadas. Nesta região, laticíferos estão presentes, bem como, idioblastos secretores; idioblastos cristalíferos foram observados apenas em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula*. Em secção longitudinal foi possível observar que os laticíferos são articulados anastomosados, assim como os observados no caule. O colênquima angular é formado por três a quatro camadas celulares, exceto em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* subsp. *tenuifolia* que exibiu duas a três camadas. O parênquima fundamental interno possui duas a três camadas de células isodiamétricas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* que exibiu duas a três camadas. O parênquima fundamental interno possui duas a três camadas de células isodiamétricas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* e uma a duas camadas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* e uma a duas camadas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* e uma a duas camadas em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* subsp. *rigidula*. Nesta região, cristais foram observados em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 4c1). A bainha parenquimática exibiu a mesma conformação da bainha do caule.

O periciclo é constituído por fibras que formam um anel contínuo externamente ao tecido floemático (Fig. 4a–d); *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* exibiu três a quatro camadas celulares e duas a três camadas em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*. Em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pent* 

O sistema vascular em início de crescimento secundário apresentou quatro a seis feixes vasculares do tipo colateral em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 3a), seis em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 3b, c), e quatro feixes em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Fig. 3d). O floema primário e secundário no pecíolo assemelha-se ao do caule (Fig. 4e–h); laticíferos articulados anastomosados também ocorrem. O câmbio vascular não está completo e pode-se observar atividade apenas do câmbio fascicular na formação do floema e xilema secundário por meio de divisões periclinais, com floema secundário para a periferia e xilema secundário para o interior. O xilema primário está organizado em proto e metaxilema (Fig. 4e–h).

A medula é formada por células parenquimáticas, com formato isodiamétrico, de parede delgada, tamanho variado e pequenos espaços intercelulares triangulares (Fig. 3a–d); idioblastos cristalíferos foram observados apenas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*.

#### Lâmina foliar

A ala foliar em secção transversal é arqueada (Fig. 5a–c), exceto em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* com contorno plano (Fig. 5d). A margem foliar é revoluta em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 5b–d) e não revoluta em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 5a).

Em secção transversal, a epiderme adaxial é uniestratificada; as células são cobertas por cutícula espessa; o formato é retangular a circular, sendo as paredes periclinais levemente convexas e as anticlinais retas (Fig. 5e–h); *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* possui paredes periclinais e anticlinais espessadas. Na região das margens, as células epidérmicas comuns são ligeiramente arredondadas, com paredes periclinais e anticlinais espessadas (Fig. 6a–d); ainda nesta região, idioblastos contendo cristais foram observados, estes possuem tamanho menor em relação às demais células epidérmicas e são de difícil observação.

Em secção transversal, a face abaxial é formada por uma única camada de células epidérmicas comuns em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, semelhantes às células da face adaxial (Fig. 5e); entretanto, em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (Fig. 4f), *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 4g) e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Fig. 4h), as células epidérmicas se diferenciam em papilas, estas são longas e se assemelham a dedos de luva, com base mais larga e a extremidade estreita e arredondada. Os estômatos são abundantes e localizam-se no mesmo nível das células epidérmicas em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 6a1) e em cavidades delimitadas pelas papilas nas demais subespécies (Fig. 6b1–d1).

O mesofilo é isobilateral em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 5e) e dorsiventral nas demais subespécies (Fig. 5f–h). O parênquima paliçádico em todas as subespécies é compacto, composto por uma camada de células longas, estreitas e com parede celular delgada. O parênquima lacunoso é constituído por três a cinco camadas de células de tamanho e formato irregular, parede celular delgada e espaços intercelulares de tamanho variado; *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* exibiu três a cinco camadas. Laticíferos articulados anastomosados foram observados entre as células do mesofilo e nos feixes vasculares de *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*; estes são estreitos e as extremidades de suas ramificações podem chegar a ambas às faces (Fig. 7a–c). Na região das margens (Fig. 7a–d), o parênquima paliçádico e lacunoso é substituído por uma a duas camadas celulares de colênquima anelar; *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* exibiu duas a três camadas.

Feixes vasculares colaterais de grande, médio e pequeno calibre estão distribuídos por toda a extensão da lâmina foliar. Os feixes de grande calibre apresentam floema e xilema primário

envolvidos por uma bainha parenquimática, com extensão de bainha para ambas as faces e laticíferos em número de um a dois no floema (Fig. 5f–h). Os feixes de médio calibre exibem elementos do floema e xilema primário e uma bainha parenquimática com extensão de bainha apenas para a face abaxial (Fig. 5e, 6b–d), já os de pequeno calibre apresentam apenas elementos do xilema e bainha parenquimática formada por cinco a sete células (Fig. 5e–h).

#### Nervura central

A nervura central em secção transversal é levemente convexa na face adaxial e convexa na face abaxial em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 6e), biconvexo em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 6f, g) e reto-convexa em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Fig. 6h). As células epidérmicas comuns da face adaxial e abaxial são ligeiramente arredondadas e revestidas por uma cutícula espessa (Fig. 8a–d); a cutícula da face abaxial é ornamentada (Fig. 8b1), exceto em *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*, as quais possuem cutícula lisa (Fig. 8c1).

Abaixo da epiderme, ocorre colênquima angular em ambas as faces (Fig. 6e–g, 8a–c), exceto em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* apenas na face abaxial (Fig. 6h, 8d). Após o colênquima, na face abaxial, ocorrem três a quatro camadas de células de parênquima fundamental em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula*, cinco a seis em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e quatro a cinco em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*, estas possuem forma isodiamétrica, paredes celulares delgadas e pequenos espaços intercelulares triangulares (Fig. 8a–d); idioblastos secretores ocorrem nesta região, bem como, cristais de oxalato de cálcio.

O sistema vascular é colateral, disposto em arco aberto (Fig. 6e–h); *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* exibiram um feixe vascular principal e um feixe vascular acessório localizado próximo à face adaxial, ambos separados por células parenquimáticas (Fig. 6f, g).

O sistema vascular possui apenas crescimento primário. O floema primário exibiu elementos celulares do floema primário e laticíferos que se distribuem por toda sua extensão (Fig. 8b–h). Os elementos de vaso do metaxilema apresentam parede espessa e lignificada, os do protoxilema são constituídos por elementos reduzidos e comprimidos (Fig. 8e–h).

## Epiderme em vista frontal

A face adaxial exibiu células epidérmicas comuns com formato irregular, tamanho variado e paredes celulares anticlinais delgadas com contorno reto a curvo (Fig. 9a–d), exceto em *M*.

*pentaphylla* subsp. *graminifolia* onde as paredes anticlinais são espessas. Pequenas estruturas semelhantes à fenda foram observadas no limbo foliar e nas nervuras, estas são raras e possuem forma e tamanho variado (Fig. 9e). Na região das nervuras, as células epidérmicas são retangulares a quadradas com paredes celulares anticlinais espessadas (9f–i).

Os estômatos se encontram no mesmo nível das células epidérmicas comuns. Estes, em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 9a, f) e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Fig. 9d, i) se distribuem por todo o limbo foliar; em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (Fig. 9g) e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 9h) estão sempre próximos à nervura principal. Estômatos anomocítico (Fig. 9j, k) foram observados em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*. Estômatos paracíticos (Fig. 9l) e anisocíticos (Fig. 9m) ocorrem em todas as subespécies. Em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, as células subsidiárias dos estômatos apresentam estrias em suas paredes periclinais (Fig. 9a).

A face abaxial em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* é formada por células epidérmicas comuns semelhantes as da face adaxial (Fig. 9n, 10a); nas demais subespécies ocorrem células papilosas que exibem extremidades arredondadas e formam um rosário que delimitam espaços onde localizam-se os estômatos, os quais se distribuem por todo o limbo foliar e se encontram abaixo do nível das demais células (Fig. 9o, 10b–d). Na região da nervura central as células não se diferenciam em papilas e exibem forma retangular a quadrada com paredes anticlinais retas e levemente espessadas, semelhantes as da face abaxial (Fig. 9p).

## Análise micromorfológica do padrão de cera epicuticular

A análise do padrão de cera epicuticular da superfície abaxial da lâmina foliar indicou um padrão de cera em forma de crosta em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Fig. 10e), a qual se mostra como um revestimento contínuo; em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Fig. 10f, g) exibiu forma de plaquetas membranosas, com orientações irregulares; já em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* apresenta-se em plaquetas irregulares com extremidades sinuosas (Fig. 10h).

## Testes histoquímicos

As análises revelaram grãos de amido nas células do mesofilo e na bainha parenquimática dos feixes vasculares de todas as subespécies (Fig. 11a–c); apenas *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* exibiu grãos de amido nas células do colênquima e do parênquima da nervura central. Compostos lipofílicos foram detectados na cutícula, nas células epidérmicas e no interior dos laticíferos de todas as subespécies (Fig. 11d–f); *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp.

*rigidula* apresentaram também, compostos lipofílicos no mesofilo, na nervura central e nos feixes vasculares. Compostos fenólicos foram identificados no interior dos laticíferos e dos idioblastos secretores presentes no colênquima e parênquima da nervura central (Fig. 12a–c). Lignina foi detectada apenas na parede celular dos elementos de vaso (Fig. 12d–f). Os testes comprovaram a natureza dos cristais, todas as subespécies exibiram cristais de oxalato de cálcio na nervura central. A Figura 13 (a–d) traz as secções-controle para os testes histoquímicos.

#### Chave dicotômica

Com base nos caracteres anatomicos descritos, foi possível elaborar uma chave dicotômica para identificação das subespécies do complexo *M. pentaphylla*.

1. Contorno do pecíolo côncavo-convexo, ausência de células papilosas na face abaxial e mesofilo
isobilateral M. pentaphylla subsp. graminifolia.
1'. Contorno do pecíolo circular, presença de células papilosas na face abaxial e mesofilo
dorsiventral2
2. Pecíolo com seis feixes vasculares e nervura central biconvexo3
3. Ausência de estômatos anomocíticos, presença de um feixe acessório na nervura central e ala foliar arqueada
3'. Presença de estômatos anomocíticos, ausência de um feixe acessório na nervura central e ala foliar plana

2'. Pecíolo com 4 feixes vasculares e nervura central reta-convexo... *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*.

## DISCUSSÃO

### Abordagem taxonômica

Anatomicamente, os táxons aqui estudados apresentaram em comum epiderme uniestratificada, fibras pericíclicas, feixe vascular colateral, folha anfiestomática e nervura central com feixe vascular em forma de arco aberto.

Ainda em nossos estudos, foi possível identificar caracteres anatômicos de valor taxonômico e relevantes na diferenciação dos táxons estudados como: contorno e número de feixes vasculares no pecíolo, contorno e número de feixes vasculares na nervura central, tipo de mesofilo, presença de células papilosas na face abaxial, distribuição e tipo de estômatos e padrão de cera epicuticular. A forma da lâmina foliar (se arqueada ou reta) e do bordo (revoluto ou não revoluto), distribuição de tecido colenquimático na nervura central (presente ou ausente na face adaxial),

conformação da cutícula (se lisa ou ornamentada), presença de fibras gelatinosas e presença ou ausência de estrias cuticulares, somadas com os demais caracteres diagnósticos levantados, também forneceram informações valiosas para diferenciá-las.

Em todas os táxons analisados, a estrutura anatômica exibida pelo caule assemelha-se a do pecíolo. Os tecidos celulares e seus arranjos no pecíolo das dicotiledôneas são normalmente os mesmos encontrados no caule (Esaú 1974). Nossos resultados confirmam esta informação, uma vez que, o caule e o pecíolo em secção transversal exibiram contorno circular, exceto em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*; epiderme uniestratificada revestida por cutícula espessa; córtex composto por parênquima fundamental subepidérmico, colênquima angular e parênquima fundamental interno; fibras pericíclicas e feixe vascular colateral. Esta organização também se repete entre as espécies do gênero, como observada em *Manihot pilosa* Pohl e *Manihot caerulescens* Pohl (Vannucci 1982), *Manihot pseudoglaziovii* Pax e K. Hoffm., *Manihot glaziovii* Muller Arg., *Manihot esculenta* Crantz, *Manihot pohlii* Wawra (Graciano-Ribeiro et al. 2016), bem como naquelas estudadas por Nassar et al. (2008), Graciano-Ribeiro et al. (2009) e Nassar et al. (2010).

A cutícula espessa observada no caule, pecíolo e na lâmina foliar foi relatada anteriormente em outros táxons do gênero por Vannucci (1982), Silva et al. (2016a) e Silva et al. (2016 b). Epiderme revestida por cutcula delgada também pode ocorrer entre as espécies do gênero como observado por Vannucci (1982) em *Manihot pilosa* Pohl, espécie ocorrente em vegetação típica de mata.

Fibras gelatinosas aqui observadas no caule e pecíolo também foram observadas no caule de *Manihot pachycaulis* M. J. Silva (Silva et al. 2016a) e *M. glaziovii* (Nassar et al. 2010). Em nossos estudos, este caráter possiu valor diagnóstico.

O maior espessamento das fibras pericíclicas aqui observado, atua como fator diagnóstico. Dado que, considerou-se os mesmos critérios metodológicos entre os táxons estudados (folhas completamente expandidas e entrenó da mesma região) e as mesmas ocorrem em ambientes similares (seco e com baixa disponibilidade hídrica).

Em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*, o crescimento secundário no caule é menos acentuado que nas demais subespécies com elementos de vasos e fibras xilemáticas reduzidas. Uma das funções das fibras é de sustentação dos órgãos dos vegetais (Menezes et al. 2006) e neste caso, o hábito subarbustivo e prostrado de *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* pode estar associado a menor quantidade de fibras formadas durante o crescimento secundário. Rogers e Appan (1973) atribuíram o hábito subarbustivo às espécies de *Manihot* que possuem nenhuma ou pouca atividade

cambial, caracter observado nessa subespéice. O crescimento secundário menos acentuado é aqui considerado diagnóstico entre os táxons estudados.

A variação no número de feixes vasculares no pecíolo é tida como um importante fator na diferenciação das espécies de *Manihot* estudadas por Cunha Neto et al. (2014), os quais variaram entre cinco a dez, enquanto Graciano-Ribeiro et al. (2016) constataram uma variação entre seis a dez. A importância taxonômica da conformação do sistema vascular no pecíolo, também foi demostrada nos estudos de Dehgan (1982) com táxons de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae). Para este autor, a variação do número de feixes vasculares entre os grupos taxonômicos estudados está relacionada aos avanços evolutivos, onde as folhas apresentavam uma redução no número de feixes está associada à adaptação aos climas seco e quente (Dehgan 1982). Desse modo, a variação no número de feixes vasculares no pecíolo é aqui interpretada como diagnóstico.

Outra característica diagnóstica é a presença de dois tipos celulares na medula do caule de *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*. Em Euphorbiaceae, a ocorrência de dois tipos de células foi relatada na medula da nervura e do pecíolo de *Brasiliocroton mamoninha* P. Berry e I. Cordeiro (Sá-Haiad et al. 2009), no caule de indivíduos diploide e tetraploide do cultivar *M. esculenta* (Nassar et al. 2008) e em *M. glaziovii* (França et al. 2010; Nassar et al. 2010) e no pecíolo de *M. esculenta* e *M. fortalezensis* Nassar, Ribeiro, D. G., Bomfim & P.T.C. Gomes (Graciano-Ribeiro et al. 2016). Acreditamos que este carater está associado ao espessamento das paredes celulares observado na medula do caule de *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, sendo as do centro mais espessas que as paredes das células da periferia.

Laticíferos articulados anastomosados aqui observados formam um complexo sistema de secreção que se repetem em táxons de Euphorbiaceae (Castro e Demarco 2008). Estes já foram relatados em *Manihot* formando uma rede complexa no córtex, floema e na medula do caule, seguindo o curso dos feixes nas folhas e se ramificando por todo o mesofilo (Rudall 1987). Em nossos estudos, estes foram observados apenas no córtex e floema do caule e pecíolo e no mesofilo da lâmina foliar. Laticíferos não articulados também ocorreram no gênero como observados por Rudall (1987) e Cunha Neto et al. (2014). Acreditamos que, tanto o tipo de laticífero, quanto sua distribuição nos tecidos da planta podem contribuir na diferenciação de espécies do gênero.

A nervura central em vista frontal exibiu contorno levemente convexo-convexo em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, biconvexo em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e reto-convexo em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*. Cunha Neto et al. (2014) estudando a anatomia do complexo *Manihot violacea* Pohl, também notaram diferenças no contorno da nervura central, em algumas espécies era biconvexo e em outras levemente-convexo.

Este caráter é aqui utilizado como diagnóstico entre as subespécies estudadas, haja vista que, tem sido utilizado com sucesso para delimitar espécies em famílias como Euphorbiaceae (Cunha Neto et al. 2014), Myrtaceae (Gomes et al. 2009) e Leguminosae (Francino et al. 2015).

A epiderme abaxial do lobo foliar formada por papilas observada em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* foram citadas para espécies do gênero como aquelas estudadas por Silva et al. (2016b) e Vannucci (1982); entretanto, este caráter pode não estar presente como observado em *M. violacea* var. *cecropiifolia* (Pohl) Mull. Arg e *M. violacea* var. *divergens* (Pohl) Mull. Arg (Cunha Neto et al. 2014).

Todas as subespécies exibiram estômatos em ambas as faces; folha anfiestomática é característica comum em plantas que vivem em áreas com alta incidência luminosa (Mott et al. 1982); em *Manihot*, folhas anfiestomáticas foram relatadas por Vannucci (1982), Cerqueira (1992) e Cunha Neto *et al.* (2014). *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* exibiram estômatos em todo o limbo foliar, diferente de *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, os quais se encontram apenas próximos à nervura central. Estômatos próximos à nervura central também foram observados em *M. esculenta* (Cerqueira 1992). A distribuição dos estômatos é aqui utilizada como um caráter diagnóstico, de modo que este fator tem contribuído para a delimitação de táxons como observado nos estudos com *Tillandsia* L. realizados por Scatena e Segecin (2005).

Os tipos de estômatos, quanto às células subsidiárias na face adaxial, foi aqui um caráter diagnóstico. Este tem sido um fator importante na caracterização e delimitação de táxons entre as angiospermas (Metcalfe e Chalk 1950). Estômatos do tipo paracítico e anisocíticos ocorreram em todas as subespécies; os paracíticos são os mais comuns em Euphorbiaceae (Raju e Rao 1977), e no gênero, foram relatados por Vannucci (1982) e Cunha Neto et al. (2014). Estômatos anomocítico observados em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* são raros; na literatura não foram encontrados registros deste em *Manihot*.

O tipo de mesofilo é aqui interpretado como diagnóstico. Mesofilo dorsiventral observado em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* é comum em Euphorbiaceae (Senna 1984; Rôças et al. 1997; Mendonça et al. 2008; Sá-Haiad et al. 2009; Brito et al. 2011); em *Manihot* foi observado nas espécies estudadas por Vannucci (1982). Mesofilo isobilateral característico de *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, também ocorre entre as espécies do gênero, como observado por Cunha Neto et al. (2014).

A variação no número de feixes vasculares na nervura central observada nas subespécies estudadas também foi relatada por Vannucci (1982), o qual identificou dois feixes na nervura

central; Cunha Neto et al. (2014) e Silva et al. (2016b) constataram um único feixe vascular do tipo bicolateral. Uma vez que, o número de feixes vasculares na nervura central pode variar entre as espécies do gênero, este caráter é aqui interpretado como diagnóstico.

O padrão de cera epicuticular se mostrou diferente entre as subespécies, sendo em forma de crosta em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, plaquetas membranosas em *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* e *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* e plaquetas irregulares em *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*. O padrão de cera em forma de plaquetas membranosas também foi observado por Filho (2011) em *Manihot dichotoma* Ule. Embora a morfologia das ceras seja determinada por fatores genéticos (Jeffree 2006), sua produção pode ser influenciada pelas condições ambientais, tais como a temperatura, escassez de água e até mesmo ataque de patógenos e herbívoros (Cameron et al. 2002; Franchini et al. 2010). Para as subespécies aqui estudadas, apresenta valor taxonômico, sabendo que seu padrão morfológico pode variar entre os grupos taxonômicos (Barthlott e Neinhuis 1997), além de atuar como um importante caráter na delimitação de espécies em *Manihot* (Rogers e Appan 1973).

Nos idioblastos secretores presentes na lamina foliar, observou-se reação ao cloreto férrico evidenciando compostos fenólicos nas subespécies analisadas. Idioblastos secretores foram anteriormente relatados em espécies do gênero por Vannucci (1982) e Cunha Neto et al. (2014); estes podem ainda distribuir-se em diferentes tecidos da plata, nos estudos de Cunha Neto et al. (2014), a distribuição dos idioblastos apresentou valor diagnóstico. Cristais de oxalato de cálcio também foram observados nas subespécies analisadas, estes foram relatados anteriormente em Euphorbiaceae (Rôças et al. 1997, Mendonça et al. 2008) e em espécies de *Manihot* (Vannucci 1982, França et al. 2010).

Por fim, com base nas descrições anatômicas e comparações realizadas e o levantamento de caracteres de valor taxonômico, acreditamos que os táxons aqui estudados possuem caracteres satisfatórios para elevá-los ao nível de espécie.

## Abordagem ecológica

As plantas, ao longo de sua evolução, sofreram alterações estruturais para atender suas necessidades específicas decorrentes das mudanças em seu habitat, como a disponibilidade ou ausência hídrica, favorecendo sua adaptação às condições adversas do ambiente (De Micco e Aronne 2012).

A cutícula espessa aqui observada é um caráter importante para as plantas que ocorrem em ambientes quentes e áridos, pois pode evitar a perda excessiva de água causada pela transpiração em períodos de seca (Koch et al. 2009). Sabendo que as subespécies aqui estudadas ocorrem em ambiente seco e com alta radiação solar e que o Cerrado brasileiro é o centro de diversidade das espécies do gênero (Silva et al. 2016b), acreditamos que este caráter tem contribuído para sua adaptação ao ambiente.

Fibras gelatinosas compondo o caule e pecíolo foram identificadas por apresentar uma camada externa da parede celular rica em lignina e uma camada mais interna com coloração azulada e menos lignificada. Estas são comuns em plantas do Cerrado, sendo relatadas no caule de diferentes espécies ocorrentes neste bioma (Mendes e Paviani 1997, Marcati et al. 2006). A presença de fibras gelatinosas aqui observadas pode estar associada ao processo de adaptação das plantas ao ambiente seco, visto que, são atribuídas à elas a função de reserva de água (Paviani 1978) e oferece maior flexibilidade à planta (Marcati et al. 2006; Denardi et al. 2013).

O maior espessamento da parede celular das fibras pericíclicas observadas em *M*. *pentaphylla* subsp. *graminifolia* e *M. pentaphylla* subsp. *rigídula* pode estar relacionado a uma estratégia adaptativa que permite sua sobrevivência em condições adversas, como baixa disponibilidade hídrica e alta radiação solar. Nassar et al. (2008), estudando o efeito da poliploidia na tolerância à seca, observaram maior espessamento das fibras pericíclicas no caule de plantas tetraploides de *M. esculenta* e destacaram que o maior espessamento da parede celular está intimamente relacionado a resistência da planta à seca.

Ribeiro et al. (2012) e Oliveira e Miglioranza (2014) em seus estudos, atribuíram às células papilosas a função de proteção dos estômatos por evitar a perda excessiva de água por transpiração. Desse modo, acreditamos que a presença de células papilosas observadas nos táxons estudados resulta em uma estratégia adaptativa das plantas, devido ao seu ambiente apresentar alta irradiação luminosa.

Folha anfiestomática é uma característica comum em plantas que vivem em áreas com alta incidência luminosa (Mott et al. 1982). Este caráter foi observado em todos os táxons aqui analisados.

Hadacek (2002), Castro e Demarco (2008) e França et al. (2010), em seus estudos, destacaram que os cristais estão associados ao mecanismo de defesas das plantas contra herbívoros e microrganismos patogênicos e assim como os compostos fenólicos, são idioblastos comuns em plantas de clima tropical (Castro e Demarco 2008).

Desse modo, os táxons aqui estudados, estão perfeitamente adaptadas a viverem em condições de clima seco e com alta irradiação solar, visto que, apresentaram características xeromórficas como: cutícula espessa, estômatos em ambas as faces e grandes quantidades de tecido esclerenquimático, como observado no caule e pecíolo; em *M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, nota-se ainda, células epidérmicas comuns com paredes espessadas e mesofilo

isobilateral. Estas mesmas características foram relatadas por Menezes et al. (2006) como caráter xeromórfico.

### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo à primeira autora; a Pró-Reitoria de Administração e Finanças (PROAD) da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo auxílio com o transporte para a realização de visitas ao campo de estudo.

## REFERÊNCIAS

- BARTHLOTT W, NEINHUIS C, CUTLER D, DITSCH F, MEUSEL I, THEISEN I E WILHELMI H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Botanical journal of the Linnean society 126: 237–260.
- BARTHLOTT W E NEINHUIS C. 1997. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. Planta 202: 1–8.
- BRITO MS, FRIES DD, SILVA SLC E GUALBERTO AS. 2011. Anatomia foliar de Croton linearifolius Mull. Arg. Enciclopédia biosfera 7: 77–83
- CAMERON KD, TEECE MA, BEVILACQUA E E SMART LB. 2002. Diversity of cuticular wax among Salix species and Populus species hybrids. Phytochemistry 60: 715–725.
- CARMO JÚNIOR JE, SODRÉ RC, SILVA MJ E SALES MF. 2013. *Manihot* (Euphorbiaceae s.s.) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. Rodriguésia 64: 727–746.
- CASTRO D E DEMARCO MM. 2008. Laticíferos articulados anastomosados em espécies de Asclepiadeae (Asclepiadoideae, Apocynaceae) e suas implicações ecológicas. Revista Brasileira de Botânica 31: 701–713.
- CERQUEIRA YM. 1992. Efeito da deficiência de água na anatomia foliar de cultivares de mandioca *Manihot esculenta* Crantz. I Densidade estomática. Sitientibus 10: 103–115.
- CHODAT R E HASSLER E. 1905. Plantae Hasslerianae, soit énumération des plantes recoltées au Paraguay. Bulletin de l'Herbier Boissier 2,5: 1–1250. [online] http://www.bi odiversitylibrary.org/item/1049 32#page/1336/mode/1up [Accessed 10 February 2017].
- CUNHA NETO IL, MARTINS FM, CAIAFA NA E MARTINS MLL. 2014. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in *Quinquelobae* section (Euphorbiaceae). Brazilian Journal of Botany 37: 481–494.

- DE MICCO V E ARONNE G. 2012. Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought. In: Plant responses to drought stress. Springer Berlin Heidelberg 37–61.
- DEHGAN B. 1982. Comparative anatomy of the petiole and infrageneric relationships in *Jatropha* (Euphorbiaceae). American Journal of Botany 1283–1295.
- DENARDI L, TREVISAN R, PERRANDO ER, SUTILI FJ, BALDIN T E MARCHIORI JNC. 2013. Anatomia da madeira de *Phyllanthus sellowianus* Müll. Arg. Ciência Florestal 23: 503–509.
- DUPUTIÉ A, SALICK J E MCKEY D. 2011. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. Journal of Biogeography 38: 1033–1043.
- ESAÚ K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Edgard Blücher. São Paulo, 293 p.
- FILHO LOC. 2011. Interação trófica, composição química e ultraestrutura de ceras epicuticulares em espécies de Euphorbiaceae. Tese, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Dados não publicados.
- FRANÇA AA, GUIM A, BATISTA AMV, PIMENTEL RMM, FERREIRA GDG E MARTINS IDSL. 2010. Anatomia e cinética de degradação do feno de *Manihot glaziovii*. Acta Scientiarum Animal Sciences 32: 131–138.
- FRANCHINI MC, HERNANDEZ LF E LINDSTROM LI. 2010. Cuticle and cuticular wax development in the sunflower (*Helianthus annuus* L.) pericarp grown at the field under a moderate water déficit. Phyton 79: 153–161.
- FRANCINO DMT, COUTINHO IAC, DALVI VC, AZEVEDO AA, CONCEIÇÃO AS E MEIRA RMSA. 2015. Anatomical interpretations of the taxonomy of Chamaecrista (L.) Moench sect. Absus (Leguminosae–Caesalpinioideae). Plant Systematics and Evolution 301: 2087–2103.
- FRANKLIN GL. 1945. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. Nature 155: 51.
- GOMES SM, SOMAVILLA NSDN, GOMES-BEZERRA KM, MIRANDA SC, DE-CARVALHO OS E GRACIANO-RIBEIRO D. 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. Acta Botanica Brasilica 23: 223–238.
- GOMES SMA, ELDO SILVA AM, LOMBARDI JA, AZEVEDO AA E VALE FHA. 2005. Anatomia foliar como subsídio à taxonomia de Hippocrateoideae (Celastraceae) no Sudeste do Brasil. Acta Botanica Brasilica 19: 945–961.
- GRACIANO-RIBEIRO D, HASHIMOTO DYC, NOGUEIRA LC, TEODORO D, MIRANDA SF E NASSAR NMA. 2009. Internal phloem in an interspecific hybrid of cassava, an

indicator of breeding value for drought resistance. Genetics and molecular research 8: 1139–1146.

- GRACIANO-RIBEIRO D, HASHIMOTO-FREITAS DY E NASSAR NMA. 2016. Comparative petiole anatomy of cassava (*Manihot*) species. Genetics and molecular research 15: 1–13.
- HADACEK F. 2002. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. Plant Science 21: 273–322.
- HOWARTH W E WARNE LGG. 1959. Practical Botany for the Tropics, University of London, London, 238.
- JEFFREE CE. 2006. The fine structure of the plant cuticle. In: Riederer M E Müller C. Biology of the Plant Cuticle, Würzburg, Blackwell Publishing, p. 12–125.

JOHANSEN DA. 1940. Plant microtechinique. McGraw-Hill Book, New York, 523p.

- KOCH K, BHUSHAN B E BARTHLOTT W. 2009. Multifunctional surface structures of plants: An inspiration for biomimetics. Progress in Materials Science 54: 137–178.
- KRAUS JE E ARDUIN M. 1997. Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal. Seropédica: Edur, Rio de Janeiro, 198p.
- LANGERON M. 1949. Précis de microscopie. Masson et Cie. Editers, n. 7. Paris, 1430 p.
- LEWIS NG E YAMAMOTO E. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual review of plant biology 41: 455–496.
- MARCATI CR, OLIVEIRA JS, MACHADO SR. 2006. Rings in cerrado woody species: occurrence and anatomical markers. Biota Neotropica 6: 0–0.
- MENDES IDCA, E PAVIANI TI. 1997. Morfo-anatomia comparada das folhas do par vicariante Plathymenia foliolosa Benth. E Plathymenia reticulata Benth. (Leguminosae-Mimosoideae). Brazilian Journal of Botany 20: 185–195.
- MENDONÇA MS, ILKIU-BORGES F, SOUZA MC. 2008. Anatomia foliar de Croton cajucara Benth. (Euphorbiaceae) como contribuição ao estudo farmacognóstico de plantas da região amazônica. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 10:18–25.
- MENEZES NL, SILVA DC, PINNA GFAM. 2006. Folha. *In*: Appezzato-da-Glória B, Carmello-Guerreiro SM. Anatomia vegetal, 2<sup>a</sup> ed., Viçosa: UFG, p. 303–325.
- METCALFE CR, CHALK L. 1950. Anatomy of the dicotyledons. Oxford Claredon, n, 1 e 2. Oxford.
- METCALFE CR E CHALK L. 1979. Anatomy of the dicotyledons. Systematic anatomy of leaf and stem, with a brief history of the subject. Clarendon Press, n, 1. Oxford, 276 p.
- MOTT KA, GIBSON AC E LEARY JO. 1982. The adaptive significance of amphistomatic leaves. Plant, Cell and Environment 5: 455–460.

- MÜLLER AJ. 1874. Flora Brasiliensis. Missouri Botanical garden 11: 1–752. [online] http://www.biodiversitylib rary.org/page/145029#page/3/mode/1up [Accessed 10 February 2017].
- NASSAR NMA, ABREU LFA, TEODORO DAP E GRACIANO-RIBEIRO D. 2010. Drought tolerant stem anatomy characteristics in *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) and a wild relative. Genetics and molecular research 9: 1023–1031.
- NASSAR NMA, GRACIANO-RIBEIRO D, FERNANDES SDC E ARAUJO PC. 2008. Anatomical alterations due to polyploidy in cassava, *Manihot esculenta* Crantz. Genetics and Molecular Research 7: 276–283.
- OLIVEIRA EC E MIGLIORANZA É. 2014. Densidade e distribuição estomática em mandioca Manihot esculenta Crantz cultivar IAC 576-70. Scientia Agropecuaria 5: 135–140.
- OLIVEIRA RP, LONGHI-WAGNER HM E LEITE KRB. 2008. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia de *Raddia* Bertol. (Poaceae: Bambusoideae). Acta Botanica Brasilica 22: 1–19.
- PAIVA JGA, FANK-DE-CARVALHO SM, MAGALHÃES MP E GRACIANO-RIBEIRO D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. Acta Botânica Brasílica 20: 257–264.
- PAVIANI TI. 1978. Anatomia vegetal e cerrado. Ciência e Cultura 30: 1076-1086.
- POHL JE. 1827. Plantarum brasiliae icones et descriptiones. 1: 1–152. [online] http://www.b iodiversitylibrary.org/page/276186#page/8/mode/1up [Accessed 10 February 2017].
- RAJU VS E RAO PN. 1977. Variation in the structure and development of foliar stomata in the Euphorbiaceae. Botanical Journal of the Linnean Society 75: 69–97.
- REIS C, ANGELA CB E SAJO MG (2005), Anatomia foliar de Melastomataceae do cerrado do Estado de São Paulo. Revista Brasileira de Botânica 28: 451–466.
- RIBEIRO MNO, CARVALHO SP, PEREIRA FJ E CASTRO EM. 2012. Anatomia foliar de mandioca em função do potencial para tolerância à diferentes condições ambientais. Revista Ciência Agronômica 43: 354–361.
- RIO MCS, KINOSHITA LS E CASTRO MM. 2005. Anatomia foliar como subsídio para a taxonomia de espécies de *Forsteronia* G. Mey. (Apocynaceae) dos cerrados paulistas. Revista Brasileira de Botânica 28: 713-726.
- ROGERS DJ, APPAN S.G. 1973. *Manihot* and Manihotoides (Euphorbiaceae). A computerassisted study. Flora Neotropica, Monograph 13. Hafner Press, New York, 272 p.

- RÔÇAS G, BARROS CF E SCARANO FR. 1997. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. Trees 11: 469–473.
- RUDALL PJ. 1987. Laticifers in Euphorbiaceae-a conspectus. Botanical Journal of the Linnean Society 94: 143–163.
- SÁ-HAIAD B, SERPA-RIBEIRO ACC, BARBOSA CN, PIZZINI D, LEAL DO, SENNA-VALLE L E SANTIAGO-FERNANDES LDR. 2009. Leaf structure of species from three closely related genera from tribe *Crotoneae* Dumort. (Euphorbiaceae s.s., Malpighiales). Plant Systematics and Evolution 283: 179–202.
- SASS, JE Botanical Microtechnique. 1951. Iowa State College Press, Iowa. 228p.
- SCATENA VL E SEGECIN S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. Revista Brasileira de Botânica 28: 635–649.
- SENNA LM. 1984. Maprounea Aubl. (Euphorbiaceae). Considerações taxinômicas e anatômicas das espécies sul-americanas. Rodriguésia 36: 51–78.
- SILVA MJ E SODRÉ RC. 2014. A dwarf species of Manihot Mill. (Euphorbiaceae s. s.) from the highlands of Goiás, Brazil. Systematic Botany 39: 222–226.
- SILVA MJ, ALONSO AA E SODRÉ RC. 2016a. *Manihot pachycaulis* sp. Nov (Euphorbiaceae) from the Brazilian Cerrado. Nordic Journal of Botany 34: 60–65.
- SILVA MJ, INOCENCIO LS E ALONSO AA. 2016b. Manihot allemii sp. nov. (Euphorbiaceae s.s.) with entire and unlobed leaves from northern Brazil, with notes about foliar anatomy. Nordic Journal of Botany 34: 134–140.
- THIERS, B. 2016. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. [online] http://sweetgum.nybg.org/s cie nce/ih/. [accessed 15 July 2016].
- VANNUCCI AL. 1982. Anatomia comparada de duas espécies nativas de Monihot Mill (Euphorbiaceae Juss). Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Dados não publicados.
- VOSTER P. 1990. Anatomy of the South African species of Mariscus (Cyperaceae), and its relation to environmental conditions. Mitteilungen aus dem Institut f
  ür allgemeine Botanik in Hamburg 23: 367–386.

## **TABELAS E FIGURAS**

**Tabela 1.** Matriz de presença (1) e ausência (0) dos caracteres morfológicos e anatômicos dos táxons do complexo

 Manihot pentaphylla

Características		GRA	PEN	RIG	TEN
01.	Hábito arbustivo	1	1	1	0
02.	Hábito subarbustivo	0	0	0	1
03.	Orientação de crescimento ereto	1	1	1	0
04.	Orientação de crescimento prostrado a decumbente	0	0	0	1
05.	Caule com cristais no parênquima subepidérmico	*	0	1	0
06.	Caule com cristais no parênquima interno	*	0	1	0
07.	Caule com fibras gelatinosas no periciclo	*	0	1	0
08.	Caule com fibras pericíclicas com paredes espessadas	*	0	1	0
09.	Crescimento secundário do caule menos acentuado	*	0	0	1
10.	Presença de idioblastos secretores no caule	*	0	1	1
11.	Ausência de idioblastos secretores no caule	*	1	0	0
12.	Parênquima medular do caule com dois tipos celulares	*	1	0	0
13.	Parênquima medular do caule com um tipo celular	*	0	1	1
14.	Pecíolo com contorno côncavo-convexo	1	0	0	0
15.	Pecíolo com contorno circular	0	1	1	1
16.	Células epidérmicas comuns do pecíolo com paredes espessadas	1	0	0	0
17.	Pecíolo com cristais no parênquima subepidérmico	0	0	1	0
18.	Pecíolo com cristais no parênquima interno	1	0	1	0
19.	Pecíolo com fibras gelatinosas no periciclo	1	0	1	0
20.	Pecíolo com fibras pericíclicas com paredes espessadas	1	0	1	0
21.	Pecíolo com 4-6 feixes vasculares	1	0	0	0
22.	Pecíolo com 6 feixes vasculares	0	1	1	0
23.	Pecíolo com 4 feixes de xilema	0	0	0	1
24.	Idioblastos secretores na medula do pecíolo	0	0	1	1
25.	Cristais na medula do pecíolo	1	0	0	0
26.	Ala foliar com contorno arqueado	1	1	0	1
27.	Ala foliar com contorno plano	0	0	1	0
28.	Margem foliar revoluta	0	1	1	1
29.	Margem foliar não revoluta	1	0	0	0
30.	Células epidérmicas comuns da face adaxial com paredes espessadas	1	0	0	0
31.	Células epidérmicas comuns da face adaxial com paredes delgadas	0	1	1	1
32.	Lâmina foliar com células epidérmicas comuns na face abaxial	1	0	0	0
33.	Lâmina foliar com epiderme abaxial papilosa	0	1	1	1
34.	Mesofilo isobilateral	1	0	0	0
35.	Mesofilo dorsiventral	0	1	1	1
36.	Presença de laticíferos articulados anatomosado no mesofilo	0	1	1	1
37.	Nervura central levemente convexa-convexa	1	0	0	0
38.	Nervura central biconvexo	0	1	1	0
39.	Nervura central reta-convexo	0	0	0	1

40. Nervura central com cutícula epidérmica ornamentada na face abaxial	1	1	0	0
41. Nervura central com cutícula epidérmica lisa na face abaxial	0	0	1	1
42. Nervura central com extratos de colênquima angular na face adaxial	1	1	1	0
43. Nervura central com ausência de colênquima angular na face adaxial	0	0	0	1
44. Nervura central com feixe vascular principal e acessório	0	1	1	0
45. Nervura central com apenas feixe vascular principal	1	0	0	1
46. Células subsidiárias dos estômatos com estrias	1	0	0	0
47. Células subsidiárias dos estômatos sem estrias	0	1	1	1
48. Epiderme adaxial com estômatos distribuem por todo o limbo foliar	1	0	0	1
49. Epiderme adaxial com estômatos próximos à nervura central	0	1	1	0
50. Estômatos anomocítico	1	0	1	1
51. Cera epicuticular da face abaxial em forma de crosta	1	0	0	0
52. Cera epicuticular da face abaxial em forma de plaquetas membranosas	0	1	1	0
53. Cera epicuticular da face abaxial em forma de plaquetas irregulares	0	0	0	1
54. Grãos de amida na nervura central	0	0	0	1

Manihot pentaphylla subsp. graminifolia (GRA), Manihot pentaphylla subsp. pentaphylla (PEN), Manihot pentaphylla subsp. rigidula (RIG) e Manihot pentaphylla subsp. tenuifolia (TEN). (\*) Característica não observada.



**Figura 1 -** Hábito dos táxons estudados. Hábito arbustivo em *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**), *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**). Hábito subarbustivo em *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**).



**Figura 2** - Secção transversal do caule de *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**a**, **d**), *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**b**, **e**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **f**). **a**–**c**, visão geral do contorno circular; note o feixe vascular colateral. **a**, note que a medula apresenta dois tipos celulares. **b**, medula com apenas um tipo celular. **c**, observa que o crescimento secundário é menos acentuado. Detalhe do estômato na epiderme (**d1**) e das fibras gelatinosas no periciclo (**e1**). **d**-**f**, detalhe do caule evidenciando epiderme (Ep), parênquima subepidérmico (Ps), colênquima angular (Cg), parênquima interno (Pi), periciclo (Pr), floema secundário (circulo), zona cambial (Zc), xilema secundário (Xs), metaxilema (Mx), protoxilema (Px) e medula (M). **g**, laticíferos articulados anastomosado (L) no parênquima subepidérmico. Asterisco, idioblasto secretor. Barra = 1000 µm em **a**–**c**; 500 µm em **d**-**f**; 100 µm em **g**, **e1**; 50 µm em **d1**.



**Figura 3** - Seção transversal do pecíolo de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**), *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**), *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**) evidenciando o contorno côncavo-convexo (**a**) e circular (**b**-**d**) e o número de feixes vasculares. M, medula. Barra: 1000 μm.



**Figura 4 -** Seção transversal do pecíolo de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **e**), *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**, **f**), *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**, **h**). **a-d**, visão detalhada da epiderme (Ep), do córtex evidenciando parênquima subepidérmico (Ps), colênquima angular (Cg), parênquima interno (Pi) e periciclo (Pr). **a1**, fibras gelatinosa do periciclo. Cristal do tipo drusa (**c1**). **e-h**, detalhe do feixe vascular evidenciando floema (F), xilema secundário (Xs), metaxilema (Mx) e protoxilema (Px). is, idioblasto secretor; b, bainha parenquimática; c, câmbio vascular; L, laticífero. Barra: 100 µm em **a-h e a1**; 50 µm em **c1**.



**Figura 5** - Secção transversal da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **e**), *Manihot pentaphylla* subsp. *sentaphylla* subsp. *rigidula* (**b**, **f**), *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **h**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**d**, **g**). Ala foliar arqueada (**a**-**c**) e plano (**d**). **a**, margem da ala foliar não revoluta (Mn). **b**-**d**, margem da ala foliar revoluta (Mr). **e**, mesofilo isobilateral. **f**, **h**, mesofilo dorsiventral. CEC, células epidêmicas comuns; PP, parênquima paliçádico; PE parênquima lacunoso; Fvg, feixe vascular de grande calibre; Fvm, feixe vascular de médio calibre; Fvp, feixe vascular de pequeno calibre; P, papilas; eb, extensão da bainha; Cg, colênquima angular. Barra: 1000 μm em **a**-**d**; 100 μm em **e**-**h**.



**Figura 6** - Secção transversal da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **e**), *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**d**, **h**). **a-d**, margem foliar; note que as células epidérmicas comuns são ligeiramente arredondadas nesta região. **a1**, estômato no mesmo nível das células epidêmicas comuns; **b1-d1**, estômatos abaixo do nível das células papilosas. **e-h**, nervura central com feixe vascular em forma de arco aberto. Nervura central levemente convexa-convexa (**e**), biconvexa (**f**, **g**) e reto-convexo (**h**). **e**, **h**, nervura com apenas um feixe vascular principal (Fp); **f**, **g**, e feixe vascular acessório (círculo). CEC, células epidêmicas comuns; PP, parênquima paliçádico; PE parênquima lacunoso; Fvm, feixe vascular de médio calibre; Ca colênquima anular; Cg, colênquima angular. Barra: Barra = 100 μm em **a-d**; 50 μm em **a1-d1**; 500 μm em



**Figura 7** - Secção transversal da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**a**), *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**b**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**) evidenciando laticífero articulado anastomosado.



**Figura 8** - Secção transversal da nervura central de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **e**), *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**, **f**), *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**d**, **h**). **a**-**d**, detalhe da face abaxial evidenciando as células epidérmicas comuns (Cec), colênquima angular (Cg), parênquima fundamental (P). **b1**, cutícula com ornamentação. **c1**, cutícula lisa. **e-h**, detalhe do feixe vascular em forma de arco aberto. Fp, floema primário; Px, protoxilema; Mx, metaxilema; Fva, feixe vascular acessório; c, cristais; L, laticífero; is, idioblasto secretor. Barra = 100 μm em **a-h**; 50 μm em **b1** e **c2**.



**Figura 9** - Vista frontal da epiderme adaxial e abaxial da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **f**, **n**); *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**, **g**); *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**, **h**, **o**, **p**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**, **i**). Visão geral do formato das células epidérmicas comuns da face adaxial (**a**-**d**). **e**, fenda na epideme (c). **f-i**, note que as células epidérmicas da nervura cnetral são retangulares a quadradas com paredes celulares anticlinais espessadas. Na face adaxial, os estômatos se distribuem por todo o limbo foliar (**a**, **d**, **f**, **i**). **g**, **h**, note que os estômatos se localizam nas proximidades da nervura central (nc). Estômato anomocítico (**j**, **k**), paracítico (**l**) e anisocítico (**m**). Face abaxial com células epidérmicas comuns (**n**) e células papilosas (**o**). **p**, detalhe da nervura central da face abaxial. es, estrias; ns, nervura secundária. Barra = 100 µm em **a-d**; 500 µm em **f-i**; 50 µm em **e**, **j-m**.



**Figura 10** - Microscopia eletrônica de varredura da face abaxial da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *graminifolia* (**a**, **e**), *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**b**, **f**), *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**c**, **g**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**d**, **h**). Face abaxial com células epidérmicas comuns (**a**). Presença de células papilosas; nota-se que os estômatos estão abaixo do nível das demais células (**b**-**d**). Cera epicuticular em forma de crosta (**e**), plaquetas membranosas (**f**, **g**) e plaquetas irregulares (**h**). es, estrias. Barra = 50 µm em **a**-**d**; 2 µm em **e**-**h**.



**Figura 11** - Testes histoquímicos realizados em secções transversais da lâmina foliar de *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**a**, **d**); *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**b**, **e**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **f**). **a-c**, lugol para amido. **d-f**, sudan IV para compostos lipofílicos. pp, parênquima paliçádico; pe, parênquima lacunoso; b, bainha parenquimática; L, laticífero; c, cutícula epidérmica; g, gotículas de lipídios. Barra = 100  $\mu$ m.



**Figura 12** - Testes histoquímicos realizados em secções transversais da nervura central de *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**a**, **d**); *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**b**, **e**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**c**, **f**). **a-c**, cloreto férrico para compostos fenólicos (asterisco). **d-f**, floroglucinol acidificado para lignina evidenciado na parede celular dos elementos de vaso (x). P, parênquima fundamental; cl, colênquima; L, laticífero. Barra = 100 µm.



**Figura 13** - Secçoes-controle transversais da ala foliar e da nervura central. *Manihot pentaphylla* subsp. *rigidula* (**a**, **c**); *Manihot pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (**b**) e *Manihot pentaphylla* subsp. *pentaphylla* (**d**). pp, parênquima paliçádico; pe, parênquima lacunoso; b, bahinha parenquimática; nc, nervura central; al, ala foliar; cl, colênquima; x, xilema. Barra = 100 µm em **a**, **b**, **d**; 500 µm em **c**.

## Artigo 2

## Delimitation of taxa in Manihot pentaphylla complex (Euphorbiaceae) based

on morphological data

# SUBMETIDO EM 02/03/2017 AO PERIÓDICO

Botanical Journal of the Linnean Society

Delimitation of taxa in *Manihot pentaphylla* complex (Euphorbiaceae) based on morphological data

ELIFALETE SERAFIM AZEVEDO<sup>1</sup>, MARCOS JOSÉ DA SILVA<sup>1,2</sup> and DALVA GRACIANO-RIBEIRO<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Goiás, CP 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

\*Corresponding author. E-mail: dalvagraciano@gmail.com

ABSTRACT: *Manihot pentaphylla* comprises four subspecies (*M. pentaphylla* subsp. *graminifolia*, *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula*, and *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia*) with peculiar geographical distribution and interesting macro and micromorphological differences. After morphological studies of our own collections and voucher specimens, and the analysis of the peculiar geographical distribution of these taxa, we concluded they are distinct species, herein described and illustrated. Their environmental distribution and preferences, morphological relationships, flowering and fruiting periods, and conservation status are also discussed.

ADDITIONAL KEYWORDS: geographical distribution – speciation – specific complex – taxonomic circumscription.

## INTRODUCTION

A specific complex is characterized by gathering species that share similar morphological characters to the point of hindering their recognition (Carcavallo *et al.*, 2001; Longo, 2005). This fact may be related to the morphological variations of the species that compose the complex, which are sometimes referred to as diagnostic criteria by some taxonomists, but are not accepted by others. The use of morphological (Leite *et al.*, 2005), anatomical (Hefler & Longhi-Wagner, 2010; Cunha Neto *et al.*, 2014), molecular (Longo, 2005), and/or ecological (Rabelo, 2016) data in an integrated way has been useful for the delimitation of taxa of specific complexes, providing information to differentiate them and understand how they relate.
*Manihot* Mill. (Euphorbiaceae) comprises over 100 American species (Carmo Júnior *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016a; Silva *et al.*, 2016b). Brazil is the main center of diversity of these taxa, with more than 80 species (Silva & Sodré, 2014), 65 of which are distributed in the Cerrado area, located in the Midwest region of the country (Silva *et al.*, 2016b). The genus is taxonomically complex, since it exhibits considerable morphological plasticity of vegetative traits, mainly of leaves, whereas the floral morphology varies very little, and includes species capable of forming natural hybrids (Rogers & Appan, 1973; Duputié *et al.*, 2011; Silva & Sodré, 2014). However, it is easily recognized by the presence of latex, commonly lobed leaves, monochlamydeous flowers, the staminate ones with 10 stamens in two length classes, the pistillate ones with fringed stigmas, capsular fruits, costate, and carunculate seeds (Carmo Júnior *et al.*, 2013; Silva & Sodré, 2014).

The taxonomy of *Manihot* was reviewed by Rogers & Appan (1973), who classified 98 species into 19 sections. Among them, *M*. sect. *Graciles* Rogers & Appan, a taxon with 10 species, is recognized by having thick habit with slender stems, long petiolate leaves, regularly spaced along the branches, deciduous stipules, deeply lobed lamina, with lobes normally lanceolate and not overlapping basally, typical or subspicate racemes or panicles, with foliaceous and entire or serrate bracts and bracteoles (Rogers & Appan, 1973). However, in this section, some species, such as *M*. *pentaphylla* Pohl, have delimitation problems.

Rogers & Appan (1973) recognized four subspecies for *M. pentaphylla* [*M. pentaphylla* subsp. *graminifolia* (Chodat & Hassl.) Rogers & Appan, *M. pentaphylla* subsp. *pentaphylla* Pohl, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* (Müll. Arg.) Rogers & Appan, and *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* (Pohl) Rogers & Appan], which are differentiated by habit and aspects of growth, leaf lobe length and width, type of inflorescence, shape and integrity of bracts and bracteoles, among other features. These subspecies had been previously recognized as distinct species by Pohl (1827), Müller Argoviensis (1874), and Chodat & Hassler (1905). They have peculiar geographical distribution, with *M. pentaphylla subsp. Pentaphylla*, *M. pentaphylla* subsp. *rigidula* and *M. pentaphylla* subsp. *tenuifolia* distributed in the Brazilian Central Plateau, and M. *pentaphylla* subsp. *graminifolia* endemic to Paraguay.

Based on the taxonomic uncertainty of the aforementioned authors to recognize *M. pentaphylla* as a single species with subspecies, the similarities in their external morphology, the particular biogeography, and the interesting differences in characters conserved, useful in the differentiation of the species in the genus, such as shape and integrity of bracts and bracteoles, type of inflorescence, and habit, *M. pentaphylla* can be considered a specific complex (Rogers & Appan, 1973; Allem, 1989). Due to the same reasons, these taxa are commonly confused in the field and, consequently, mistakenly identified in herbaria collections. Therefore, they are promising

candidates for macro and micromorphological studies, especially on anatomical features, already proven to be useful for the determination of species of *Manihot* (Vannucci, 1982; Cunha Neto *et al.*, 2014; Graciano-Ribeiro *et al.*, 2016).

After macro and micromorphological studies, including anatomical examination, as well as observations of field populations and biogeographical data, we herein consider the subspecies of *M. pentaphylla* as distinct species. The descriptions and illustrations of *M. graminifolia*, *M. pentaphylla*, *M. rigidula*, and *M. tenuifolia* are provided. Additionally, their environmental distribution and preferences, morphological relationships, flowering and fruiting periods, and conservation status are discussed.

#### MATERIAL AND METHODS

The collections were carried out in the state of Goiás between March 2015 and May 2016, in the localities listed in Table 1, except for *M. graminifolia*, a species endemic to Paraguay, described based on voucher specimens and type collections. For the identification of the taxa, a review of specific literature (Pohl, 1827; Müller Argoviensis, 1874; Chodat & Hassler, 1905; Rogers & Appan, 1973; Carmo Júnior *et al.*, 2013), observations of the populations in the field, and analyses of voucher specimens of herbaria BM, CTES, F, G, K, M, MO, P, SCP, and UFG (acronyms follow Thiers, continuously updated), including type collections, were performed.

The morphological descriptions of the studied taxa resulted from the analyses of our own collections and voucher specimens of the aforementioned herbaria. The photographs were taken using a digital camera Canon DS126251 (Canon Inc., Tokyo, Japan). The map showing the geographical distribution of the studied taxa was created using the software Quantum Geographic Information System (QGIS) version 2.8.2. Their conservation status was based on field observations applying the criteria established by the IUCN (2016). The preparation of voucher specimens followed the traditional methods used in plant taxonomy, and these materials were deposited in the UFG herbarium.

To complement the studies, the anatomical analysis of the studied species was carried out, assessing the stem, petiole, and central lobe regions of five individuals of each species. For the analysis, the plant material was fixed in 70% FAA (37–40% formaldehyde, glacial acetic acid, 70% ethanol, 1:1:18) for 24 h and preserved in 70% ethanol (Johansen, 1940), except for *M. graminifolia*, because voucher specimens were analyzed. The herborized material was rehydrated in a decreasing ethanol series and conserved in 70% ethanol (Voster, 1990, with adaptations). Hand-made cross sections were treated with 10% and 20% sodium hypochlorite, double stained (0.3% aqueous astra blue and 0.1% aqueous safranin) (Johansen, 1940), mounted between slides,

and covered with synthetic resin (Paiva *et al.*, 2006). The photomicrographs were taken using an optical light microscope Leica DM500 coupled to a Leica ICC50 HD microscope digital camera, using the Leica LAS EZ imaging software version 1.8.1 for Windows Operating Systems (Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland).

Microscopic scanning was performed to verify the epicuticular wax pattern of the abaxial face of the leaf blade. The plant material was dehydrated in an ethanol series, critical-point dried in carbon dioxide, coated with gold, and analyzed under a scanning electron microscope Jeol JSM-6610 (Jeol Inc., Peabody, MA, USA), equipped with an Energy Dispersive Spectrometer (EDS) device (NSS Thermo Scientific Spectral Imaging Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) in the Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) of the Universidade Federal de Goiás (UFG). For the characterization and classification of the wax pattern, the terminology proposed by Barthlott *et al.* (1998) was adopted.

#### **RESULTS AND DISCUSSION**

#### TAXANOMIC TREATMENT

#### Manihot graminifolia Chodat & Hassl., Bull. Herb. Boissier, ser. 2, 5: 671. 1905. (Fig. 1).

Shrubs 40-50 cm tall, prostrate to erect; latex not seen; brown branches, discreetly exfoliating and glabrous when adult, green and not exfoliating when young. Stipules  $4-11 \times 0.5-1$  mm, linear, laciniate, persistent; petiole 6-15 cm long, concave-convex in cross section, green; leaf blade 5lobed, membranaceous, lobes  $6-10 \times 0.3 - 0.5$  cm, not overlapping at the base, dark green on the adaxial surface and opaque green on the abaxial surface, linear, margin not revolute, apex acute to acuminate; venation camptodromous, midribs yellowish and prominent on the abaxial surface. Typical racemes 4–12 cm long, bisexual, erect to pendant, lax, terminal or in the dichotomy of the branches. Staminate flowers 1.3–2 cm long; buds  $0.5-1 \times 0.4-0.8$  cm, conical to ovoid, color not seen, apex acute; pedicel 5–10 mm long, cylindrical; bracts  $1.1-1.5 \times 0.3-0.4$  cm, linear, laciniate, apex acute, glabrous, color not seen, persistent; bracteoles  $3-4 \times 1-2$  mm, linear, entire, apex acute, glabrous, color not seen, persistent; calyx  $0.8-1.5 \times 1.3-1.4$  cm, campanulate, color not seen, glabrous, lobes  $3-5 \times 2-5$  mm, triangular, apex acute to obtuse, margin discreetly involute; stamens 10, 5 larger (0.7–0.8 mm long), 5 shorter (0.5–0.6 mm long), filaments glabrous, anthers oblong, disk 10-lobed, yellowish. Pistillate flowers not seen; buds not seen; pedicel 3–5.5 cm long, cylindrical; bracts not seen; bracteoles not seen; sepals not seen; ovary not seen; disc discreetly lobed, yellowish. Capsules  $1-5 \times 4-9$  mm, globose, light green, rugose, not winged. Seeds not seen.

#### MATERIAL EXAMINED

Paraguay. Sierra de Maracayú, 1898, *Hassler, E. 5172* (K, P, BM); Asunción: municipality of Amambay, Sierra de Amambay, Sept 1933 (fr.), *Rojas 6356* (SCP); municipality of Puerto Aurora, 16 Nov 1916 (fl., fr.), *Moises & Bertoni 7452* (SCP); District of Pedro Juan Caballero, Route 5, Cerrado *sensu stricto*, 22°34'00''S, 55°44'00''W, 23 Oct 1994 (fl., fr.), *A. Krapovickas, R. M. Harley, C. L. Cristóbal & A. Schinini 45925* (CTES, MO); District of Pedro Juan Caballero, Route 5, on the way to Sierra do Corá, Cerrado arbustivo, 22°34'90''S, 55°43'03''W, 8 Mar 2002 (fl., fr.), *A. Schinini, M. Domatteis, R. Durê & M. Quintana 36083* (CTES).

#### DISTRIBUITION AND HABITAT

*Manihot graminifolia* is endemic to Paraguay (Fig. 2), with records for the municipalities of Amambay and Puerto Aurora and District of Pedro Juan Caballero. In the latter, it occurs in Cerrado vegetation, similar to the Brazilian Cerrado *sensu stricto*, on clayey soil. The species has flowers and fruits from September to March.

## CONSERVATION STATUS

This species grows in Cerrado vegetation, in an area with anthropic intervention, forming small populations of up to 10 individuals. Since the last collection was in 2002 and its real distribution is not known, we do not have accurate information to establish its conservation status. Therefore, we propose to classify it as data deficient (DD) (IUCN, 2016).

# MORPHOLOGICAL RELATIONSHIPS

*Manihot graminifolia* shares with *M. tenuifolia* the prostrate habit, linear and narrow leaf lobes (0.2–0.5 mm), laciniate stipules, laciniate staminate bracts, staminate flowers, and campanulate calyx. However, *M. graminifolia* can be distinguished by the persistent stipule (vs. caduceus in *M. tenuifolia*), long petiole, 6–15 cm long (vs. short petiole, 1–6 cm long), concave-convex in cross-section (vs. cylindrical), long leaf lobes, 6–10 cm long, [vs. short, up to 2.5–6 (8) cm long], typical racemes (vs. subspicate), long racemes (4–12 cm long) [vs. short (up to 2.5 cm long)], laxly distributed flowers (vs. congested), conic to ovoid staminate flower buds (vs. fusiform), and rough capsules (vs. waxy).

Anatomically, *M. graminifolia* shares with *M. tenuifolia* the midrib with a single vascular bundle (Fig. 3A, 3B). However, it differs from *M. tenuifolia* in having concave-convex contiguous petiole with five to six vascular bundles (Fig. 3C), pericyclic fibers with thick cell walls (Fig. 3C1), slightly convex to convex midrib, with angular collenchyma on the adaxial and abaxial surfaces

(Fig. 3A), isobilateral mesophyll, and abaxial epidermis of leaf composed of common epidermal cells (Fig. 3D). In contrast, *M. tenuifolia* has circular petiole in cross-section with four vascular bundles (Fig. 3E), pericyclic fibers with thin cell walls (Fig. 3E1), straight to convex midrib with angular collenchyma only on the abaxial surface (Fig. 3B), dorsiventral mesophyll, and abaxial epidermis of leaf composed of papillose cells (Fig. 3F).

#### Manihot pentaphylla Pohl, Plant. Bras. Icon et Descr, 1: 53, pl. 46. 1827. (Fig. 4, 5).

Shrubs 50–150 cm tall, erect; latex clear; brown or green-vinaceous branches when young, discreetly exfoliating, glabrous. Stipules  $4-1.1 \times 0.5-1$  mm, linear, entire, vinaceous, caduceus; petiole 2–7.5 cm long, cylindrical, green-vinaceous; leaf blade 5 (6–7) lobed, membranaceous, lobes  $5-14.5 \times 0.5-1$  cm, not overlapping at the base, dark green on the adaxial surface and light green on the abaxial surface, linear, margin revolute, apex acuminate; venation camptodromous, midribs yellowish and prominent on the abaxial surface. Typical racemes 3-8.5 cm long, bisexual, pendant, lax, terminal or in the dichotomy of the branches. Staminate flowers 1.8–2.3 cm long; buds  $0.5-1.2 \times 0.3-0.7$  cm, conical to ovoid, yellowish, without vinaceous streaks and spots, apex obtuse or acute; pedicel 2–5 mm long, cylindrical; bracts  $0.9-1.7 \times 0.4-1$  cm, oval to lanceolate, entire, apex acuminate, glabrous, green-vinaceous, persistent; bracteoles  $4-8 \times 1-3$  mm, lanceolate, entire, apex acute, similar to bracts; calyx  $11-15 \times 6-9$  mm, campanulate, yellowish or cream, glabrous externally and pubescent internally, lobes  $6-7 \times 4-5$  mm, triangular, apex acute and margin discreetly involute; stamens 10, 5 longer (10.8–11 mm long), 5 shorter (4.9–5 mm long), both with glabrous filaments and anthers, the latter oblong, 1.9–2 mm long; disc 10-lobed, yellowish. Pistillate flowers 0.9–1.5 cm long; buds  $0.5-0.7 \times 0.3-0.5$  cm, ovoid, glabrous, greenyellowish, apex obtuse to acute; pedicel 1–1.5 mm long, cylindrical; bract  $10-11 \times 4-5$  mm, oval to lanceolate, entire, apex acuminate, glabrous, green-vinaceous, persistent; bracteoles  $7-9 \times 1-$ 1.5 mm, similar to bracts, apex acute; sepals  $9.8-10 \times 4.5-5$  mm, oval to oval-lanceolate or oblong, green, glabrous externally and pubescent internally, margin discreetly involute; ovary  $2-2.5 \times 1-$ 1.5 mm, globose, light green, styles free at the base, with fringed stigmatic surface; disc discreetly lobed, yellow. Capsules  $7-9 \times 7-9$  mm, subglobose, light green, waxy, not winged. Seeds  $7-8 \times$ 4-4.5 mm, oblong, light gray with discreet brown to black spots; caruncle triangular, sessile, visible only ventrally.

#### MATERIAL EXAMINED

Brazil. Goiás: Corumbá de Goiás, road to the Serra dos Pireneus State Park, 18 Nov 2011, *J. E. C. Júnior et al. 99* (UFG); Pirenópolis, Serra dos Pireneus, towards the park, ca. 500 m before the belvedere, Cerrado *sensu stricto*, 15°50'1.2"S, 48°54'40.2"W, 1,061 m elev., 24 Mar 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo et al. 1, 2, 3*, and *4* (UFG); Serra dos Pireneus, road to the Abade waterfall, ca. 1 km after the gate, Cerrado *sensu stricto*, 15°49'56.98"S, 48°52'56.762"W, 1,092 m elev., 17 Dec 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo & R. C. Teixeira 23, 24*, and 25 (UFG). Serra dos Pireneus, 500 m after the belvedere, by the roadside, on rocky sediments, 15°49'29.501"S, 48°54'24.030"W, 1,159 m elev., 17 Dec 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo & R. C. Teixeira 26* and 27 (UFG).

## DISTRIBUITION AND HABITAT

This species seems to be endemic to the state of Goiás (Fig. 6), where it occurs in the municipalities of Pirenópolis, Corumbá de Goiás, and Mossâmedes, the first two located in a mountain range locally named Serra dos Pireneus and the third in the Serra Dourada. *Manihot pentaphylla* always grows erect and forms expressive populations in Cerrado *sensu stricto*, Cerrado rupestre, and dry forest clearings, on clayey, sandy-clayey, or stony soils, between 1,061 m and 1,159 m elev. The flowers and fruits are observed between November and March, and the most intense fruiting occurs in December.

#### CONSERVATION STATUS

We propose to classify *M. pentaphylla* as least concern (LC) (IUCN, 2016) because its populations are separated from each other by over 300 km and are usually abundant where they occur.

## MORPHOLOGICAL RELATIONSHIPS

*Manihot pentaphylla* is most similar morphologically to *M. rigidula* due to the shrubby and erect habit, leaves with large and long lobes (5–14.5 cm long), entire stipules, typical racemes, entire bracts and bracteoles of flowers of both sexes, and calyx of the staminate and pistillate flowers pubescent internally. However, *M. pentaphylla* has lax inflorescences (vs. congested in *M. rigidula*), broad staminate bracts (4–10 mm wide) involving almost all the floral bud (vs. narrow, 1–2 mm), yellowish staminate calyx,  $1.1-1.5 \times 0.6-0.9$  cm, with vinaceous streaks, glabrous filaments and anthers (vs.  $0.7-0.8 \times 1.3-1.4$  cm, pubescent filaments and anthers), greenish pistillate sepals (vs. whitish), and seeds with triangular caruncle, sessile, and visible only ventrally (vs. reniform, apical, and visible on both sides).

Anatomically, *M. pentaphylla* and *M. rigidula* share the circular petiole in cross-section (Fig. 3G, 3H), biconvex midrib with a main vascular bundle and an accessory vascular bundle (Fig. 3I, 3J), dorsiventral mesophyll (Fig. 3K, 3L), epicuticular wax pattern on the abaxial surface of the leaf blade composed of membranous plates (Fig. 5I, 8I), and petiole with six vascular bundles (Fig. 3G, 3H). However, *M. pentaphylla* differs from *M. rigidula* in having arched leaf wing in cross-section (Fig. 3M) and pericyclic fibers with discreetly thickened cell walls (Fig. 3F, detail), whereas *M. rigidula* has flat leaf wing in cross-section (Fig. 3N) and pericyclic fibers with conspicuously thickened cell walls (Fig. 3C1).

#### Manihot rigidula Müll. Arg. Fl. Bras. (Martius) 11(2): 474. 1874. (Fig. 7, 8).

Shrubs 40–90 cm tall, erect; latex clear; brownish to green-vinaceous branches when young, discreetly exfoliating, glabrous. Stipules  $3-4 \times 0.5-1$  mm, linear, entire, vinaceous, caduceus; petiole 2–9 cm long, cylindrical, green-vinaceous to pinkish; leaf blade 5 (3–4) lobed, chartaceous, lobes  $5-12 \times 0.5-1$  cm, not overlapping at the base, dark green on the adaxial surface and light green on the abaxial surface, linear, revolute margin, apex acuminate; venation camptodromous, midrib yellowish and prominent on the abaxial surface. Typical racemes 1.5–3.9 cm long, bisexual, pendant, congested, terminal or in the dichotomy of the branches. Staminate flowers 1.1–2.3 cm long; buds  $0.8-0.9 \times 0.4-0.5$  cm, conical to ovoid, green with purplish streaks, apex acute; pedicel 3–5 mm long, cylindrical; bracts  $2-8.5 \times 1-5$  mm, lanceolate, entire, apex acute, glabrous, greenvinaceous, persistent; bracteoles  $5-7 \times 1-2$  mm, lanceolate, entire, apex acute, similar to bracts; calyx  $0.7-0.8 \times 1.3-1.4$  cm, campanulate, yellowish to cream, with vinaceous streaks, glabrous externally and pubescent internally, lobes  $4.9-5 \times 3.4-3.5$  mm, triangular, apex obtuse and margin discreetly involute; stamens 10, 5 longer (5.5–7 mm long), 5 shorter (1.5–3 mm long), both with pubescent filaments and anthers, the latter oblong, 1.9–2 mm long; disc 10-lobed, yellowish. Pistillate flowers 1.5–2.2 cm long; buds  $0.5-0.6 \times 0.2-0.4$  cm, conical to ovoid, glabrous, yellowgreenish, apex obtuse to acute; pedicel 5–7 mm long, cylindrical; bracts 5–7  $\times$  3–3.5 mm, lanceolate, entire, apex acute, glabrous, green-vinaceous, persistent; bracteoles  $1-2 \times 0.5-1$  mm, similar to bracts, apex acute; sepals  $0.7-0.9 \times 0.3-0.4$  cm, oval to oval-lanceolate or oblong, white, glabrous externally and pubescent internally, margin discreetly convolute; ovary  $3 \times 2$  mm, oblong, light green, styles free at the base, with fringed stigmatic surface; disc discreetly lobed, yellowish. Capsules  $1.2-1.3 \times 0.7-0.8$  cm, oblong, light green, waxy, not winged. Seeds  $6-7 \times 4-$ 5 mm, oblong, light gray with discreet brown to black spots; caruncle reniform, apical, visible on both sides.

#### MATERIAL EXAMINED

Brazil. Goiás: Caiapônia, ca. 40 km after Jataí, Cerrado *sensu stricto*, 17°18'19.2"S, 51°53'14.7"W, 862 m elev., 17 Nov 2015 (fl., fr.), *T. M. S. Melo & P. S. Pereira 475* and *479* (UFG); *ib.*, on the road BR-158, km 199, Cerrado rupestre, 17°18'15.436"S, 51°53'12.250"W, 812 m elev., 6 Dec 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo et al. 15* and *16* (UFG).

#### DISTRIBUITION AND HABITAT

*Manihot rigidula* is distributed in the states of Goiás and Minas Gerais (Fig. 9) (Rogers & Appan, 1973). In the state of Goiás, it occurs between the municipalities of Jataí and Caiapônia and forms small populations in Cerrado *sensu stricto* and Cerrado rupestre. It always grows erect on sandy and stony soils, between 812 m and 862 m elev. It was collected with flowers from November to March, and with more abundant fruits in December.

## CONSERVATION STATUS

Although *M. rigidula* forms small populations (up to 20 individuals), it occurs in the state of Goiás, in the Midwest region of Brazil, and in the state of Minas Gerais, in the Southeast region, and usually has abundant flowers and fruits. Therefore, we propose to classify it as least concern (LC) (IUCN, 2016).

#### MORPHOLOGICAL RELATIONSHIPS

*Manihot rigidula* is similar to *M. pentaphylla* mainly due to the habit and foliar characters (size and shape of leaf lobes), but it is distinguished from it by floral and anatomical characters. *Manihot rigidula* is easily recognized by the following combination of characters: shrub with erect habit, leaves with pinkish petioles and rigid chartaceous lobes, staminate buds with conspicuous vinaceous or purplish streaks, calix short and widely campanulate, and seeds with prominent caruncle conspicuously visible on both faces.

Despite the anatomical characters common to *M. rigidula* and *M. pentaphylla* as already discussed, *M. rigidula* also presents a medullary parenchyma of the stem formed by one cell type, while *M. pentaphylla* has medullary parenchyma of the stem formed by two cell types (Fig. 3O, 3P).

Subshrubs 40 cm tall, prostrate to decumbent; latex clear; brown or vinaceous branches, discreetly exfoliating when adult, brown or green-vinaceous and not exfoliating when young, glabrous. Stipules  $1-6 \times 0.5-1$  mm, linear, laciniate, vinaceous, caduceus; petiole 1–6 cm long, cylindrical, green-vinaceous; leaf blade 5(6)-lobed, membranaceous, lobes  $2.5-6(8) \times 0.2-0.5$  cm, linear, not overlapping at the base, dark green on the adaxial surface and light green on the abaxial surface, margin not revolute, apex acuminate; venation camptodromous, midrib yellowish and prominent on the abaxial surface. Subspicate racemes, 1–2.5 cm long, bisexual, erect, congested, terminal or in the dichotomy of the branches. Staminate flowers 10–11 mm long; buds  $0.4-1.0 \times 0.4-0.6$  cm, fusiform, green-yellowish with vinaceous streaks, apex acute to obtuse; pedicel 0.5–0.8 mm long, cylindrical; bracts  $4-9 \times 1-2$  mm, lanceolate, laciniate or serrate, apex acuminate, glabrous, greenvinaceous, persistent; bracteoles  $2-5 \times 0.5-1$  mm, lanceolate, laciniate to serrate, apex acute, similar to bracts; calyx  $10-12 \times 3-4$  mm, campanulate, whitish to greenish, glabrous, lobes  $7 \times 3$ mm, triangular, apex obtuse, and margin discreetly involute; stamens 10, 5 longer (3 mm long), 5 shorter (1.5 mm long), both with glabrous filaments and anthers, the latter oblong, 1.5 mm long; disc 10-lobed, yellowish. Pistillate flowers 10 mm long, buds  $0.4-0.9 \times 0.3-0.6$  cm, fusiform, glabrous, cream-greenish, apex obtuse to acute; pedicel 0.5–1 mm long, cylindrical; bracts  $6 \times 2$ mm, lanceolate, laciniate to serrate, apex acuminate, glabrous, green-vinaceous, persistent; bracteoles  $2-3 \times 0.5-1$  mm, similar to bracts, apex acute; calyx tubular, cream-greenish, with vinaceous streaks, glabrous, lobes  $6 \times 2$  mm, triangular, apex acute, and margin discreetly involute; ovary  $1-1.5 \times 1-1.5$  mm, globose, light green, styles free at the base, with fringed stigmatic surface; disc discreetly lobed, yellowish. Capsules  $8-9 \times 8-9$  mm, globose or oblong, light green, waxy, not winged. Seeds  $4.9-5 \times 3.9-4$  mm, ovoid to oblong, light gray, with discreet brown to black spots; caruncle reniform, apical, visible on both sides.

#### MATERIAL EXAMINED

Brazil. Goiás: road GO-070, 29.3 km from Itaberaí, towards the municipality of Goiás, Cerrado rupestre, 15°55′00″S, 50°10′00″W, 790 m elev., 8 Nov 1996 (fl., fr.), *A. C. Allem et al.* 4595 (UFG); Mossâmedes, Serra Dourada State Park, between the semideciduous forest and the Cerrado, in a stony area, 28 Jan 2011 (fl., fr.), *M. J. Silva 3338* (UFG); Serra Dourada State Park, near the transmission antenna, in Cerrado rupestre, 29 Jan 2011 (fl., fr.), *M. J. Silva 3376*, 3377, and 3378 (UFG); Serra Dourada State Park, in a sandy field, 29 Oct 2011 (fl., fr.), *M. J. Silva 3930* (UFG); Serra Dourada State Park, after the dried woods near the Piçarrão stream, in Cerrado *sensu* 

*stricto*, 30 Oct 2011 (fl., fr.), *J. E. C. Júnior et al.* 65, 66, and 70 (UFG); Serra Dourada State Park, in the hill of the telephone antenna, ca. 500 m before the gate towards the headquarters of the park, in Cerrado *sensu stricto*, 16°04′4.5″S, 50°11′13.8″W, 929 m elev., 14 Mar 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo & T. M. S. Melo* 7 (UFG); 16°04′46.7″S, 50°11′20.8″W, 1,009 m elev., 31 Oct 2015 (fl., fr.), *E. S. Azevedo & T. H. S. Sampaio* 9, 10, 11, 12, 13, and 14 (UFG).

#### DISTRIBUITION AND HABITAT

*Manihot tenuifolia* is endemic to the state of Goiás (Fig. 12), with records for the municipalities of Caiapônia and Mossâmedes. In the latter, it occurs in the Serra Dourada in Cerrado *sensu stricto*, Cerrado rupestre, and Campo sujo, on sandy, clayey-rocky, and stony soils, between 929 m and 1,009 m elev. In Cerrado *sensu stricto*, it grows commonly prostrate, with several branches from a xylopodiferous base, while in Cerrado rupestre, it is little branched and decumbent. Flowering and fruiting occur between October and March.

#### CONSERVATION STATUS

Although *M. tenuifolia* is endemic only to the state of Goiás, it grows in mountainous areas with preserved vegetation, forming expressive populations (more than 60 individuals) over 400 km distant from each other. Therefore, its conservation status herein proposed is least concern (LC) (IUCN, 2016).

#### MORPHOLOGICAL RELATIONSHIPS

*Manihot tenuifolia* shares with M. *pentaphylla* and *M. rigidula* the 5-lobed leaves, linear and caduceua stipules, terminal inflorescences or in the dichotomy of the branches, campanulate staminate calyx, and waxy and not winged capsules. However, it is different from both species by the predominantly prostrate, cespitose, and subshrubby habit, or if decumbent, the branches up to 40 cm (vs. shrub 50–150 cm tall in *M. pentaphylla* and 40–90 cm tall in *M. rigidula*), stipules laciniate and serreate (vs. entire), leaf lobes short and narrow [2.5–6 (8) × 0.2–0.5 cm] (vs. 5–14.5 × 0.5–1 cm in *M. pentaphylla* and 5–12 × 0.5–1 cm in *M. rigidula*), flowers of both sexes with calyx internally glabrous (vs. pubescent), and gamosepalous pistillate calyx (vs. polysepalous).

Anatomically, *M. tenuifolia* differs from *M. pentaphylla* and *M. rigidula* by having convex midrib with only one collateral vascular bundle, absence of angular collenchyma on the adaxial side of the midrib (Fig. 3B), petiole with four vascular bundles (Fig. 3E), and epicuticular wax pattern on the abaxial surface of the leaf blade composed of irregular plates (Fig. 11J). *Manihot pentaphylla* and *M. rigidula* have biconvex midrib with two collateral vascular bundles, adaxial

surface of the midrib with angular collenchyma (Fig. 3I, 3J), petiole with six vascular bundles (Fig. 3G, 3H), and epicuticular wax pattern on the abaxial surface of the leaf blade composed of membranous plates (Fig. 5I, 8I). Table 2 shows the anatomical characters diagnosed in the species studied.

## **KEY IDENTIFICATION**

1. Persistent stipules and pedicel of pistillate flowers 3-5.5 cm long						
1'. Caduceus stipules and pedicel of pistillate flowers 0,1-1,5 cm long2						
2. Shrubs, entire stipules, typical racemes, entire bracts, pistillate flowers dialyssalas and						
internal surface of staminate flowers and pistillate pubescent						
3. Lax racemo, glabrou stamens and caruncle triangular, sessile and visible only						
ventrally						
3'. Congested racemo, pubescent stamens and caruncle reniform, apical and visible						
on both sides						
2'. Subshrubs, laciniate stipules, subspicate racemes, laciniate bracts, pistillate flowers						
gamosepalous and internal surface of staminate flowers and pistillate						
glabrou						

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank: the Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support given to the first author; the coordination of the Postgraduate Program in Plant Biodiversity for providing transportation for the botanical expeditions; the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant on productivity (Process no. 307371/2013-1) to the second author; and Suzana Oellers for English language editing.

#### REFERENCES

- Allem AC. 1989. A revision of *Manihot* section *Quinquelobae* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 49: 1–26.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H. 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126: 237–260.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Steindel M, Pinto CJC. 2001. Nova espécie do complexo *oliveirai* (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera,

Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96:** 71–79.

- **Carmo Júnior JE, Sodré RC, Silva MJ, Sales MF. 2013.** *Manihot* (Euphorbiaceae s.s.) no Parque Estadual da Serra Dourada, Goiás, Brasil. *Rodriguésia* **64:** 727–746.
- Chodat R, Hassler E. 1905. Plantae Hasslerianae soit énumération des plantes recoltées au Paraguay par le Dr. Émile Hassler, d'Aarau (Suisse) de 1885 à 1902. Bulletin de l'Herbier Boissier ser. 2, 5: 1–1250. Available at: http://www.bi odiversitylibrary.org/item/1049 32#page/1336/mode/1up
- Cunha Neto IL, Martins FM, Caiafa AN, Martins MLL. 2014. Leaf anatomy as subsidy to the taxonomy of wild *Manihot* species in *Quinquelobae* section (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 37: 481–494.
- Duputié A, Salick J, McKey D. 2011. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography* 38: 1033–1043.
- Graciano-Ribeiro D, Hashimoto-Freitas DY, Nassar NMA. 2016. Comparative petiole anatomy of cassava (*Manihot*) species. *Genetics and Molecular Research* 15: 1–13.
- Hefler SM, Longhi-Wagner HM. 2010. A contribuição da anatomia foliar para a taxonomia das espécies de *Cyperus* L. subg. *Cyperus* (Cyperaceae) ocorrentes no sul do Brasil. Acta Botanica Brasilica 24: 708–717.
- **IUCN. 2016.** *Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria.* Version 12. Prepared by the Standards and Petitions Subcommittee. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. Available at: http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf
- Johansen DA. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Leite KRB, Simão-Bianchini R, Santos FAR. 2005. Morfologia polínica de espécies do gênero Merremia Dennst. (Convolvulaceae) ocorrentes no Estado da Bahia, Brasil. Acta Botanica Brasilica 19: 313–321.
- **Longo D. 2005.** Delimitação taxonômica do complexo *Petunia integrifolia*: uma abordagem molecular. Unpublished Master's Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Müller Argoviensis J. 1874. Euphorbiaceae: Manihot. In: von Martius CFP, Eichler AG, Urban I, eds. *Flora Brasiliensis*. v. 11. no. 2. F. Leipzig : Fleischer, 437–486. Available at: http://www.biodiversitylibrary.org/page/145029#page/3/mode/1up
- Paiva JGA, Fank-de-Carvalho SM, Magalhães MP, Graciano-Ribeiro D. 2006. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. Acta Botânica Brasílica 20: 257–264.

- **Pohl JE. 1827.** *Plantarum brasiliae icones et descriptiones hactenus ineditae*. Vindobonae, Antonii Strauss. v. 1. Available at: http://www.biodiversitylibrary.org/page/276186#pag e/8/mode/1up
- **Rabelo PM. 2016.** "Complexo *Epidendrum secundum*" como modelo de estudo multidisciplinar na delimitação de espécies. Unpublished Master's Dissertation, Universidade Estadual Paulista.
- **Rogers DJ, Appan SG. 1973.** *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiacea), a computer-assisted study. Flora Neotropica, Monograph no. 13. New York: Hafner Press.
- Silva MJ, Sodré RC. 2014. A dwarf species of Manihot Mill. (Euphorbiaceae s. s.) from the highlands of Goiás, Brazil. *Systematic Botany* 39: 222–226.
- Silva MJ, Alonso AA, Sodré RC. 2016a. *Manihot pachycaulis* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the Brazilian Cerrado. *Nordic Journal of Botany* 34: 60–65.
- Silva MJ, Inocencio LS, Alonso AA. 2016b. *Manihot allemii* sp. nov. (Euphorbiaceae s.s.) with entire and unlobed leaves from northern Brazil, with notes about foliar anatomy. *Nordic Journal of Botany* 34: 134–140.
- Thiers B. (continuously updated). *Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff.* New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at: http://sweetgum.nybg.org/science/ih/
- Vannucci AL. 1982. Anatomia comparada de duas espécies nativas de *Manihot* Mill. (Euphorbiaceae). Unpublished Master's Dissertation, Universidade Estadual de Campinas.
- Voster P. 1990. Anatomy of the South African species of *Mariscus* (Cyperaceae), and its relation to environmental conditions. *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg* 23: 367–386.

# TABLES AND FIGURES

Species	Habitat	Collection site Voucher no.		Herbarium
M. graminifolia	Cerrado sensu	Paraguay	A. Schinini et al.	CTES
	stricto		36083	
M. pentaphylla	Cerrado sensu	Serra dos Pireneus State Park,	E. S. Azevedo & R.	UFG
	stricto	Pirenópolis (GO)	C. Teixeira 27*	
M. rigidula	Cerrado sensu	Caiapônia (GO)	E. S. Azevedo et al.	UFG
	stricto		$16^{*}$	
M. tenuifolia	Cerrado rupestre	Serra Dourada State Park,	E. S. Azevedo & T.	UFG
		Mossâmedes (GO)	H. S. Sampaio 14 $^{*}$	

Table 1. Manihot specimens studied

\*Material collected in the field and deposited at the Universidade Federal de Goiás (UFG) herbarium.

# Table 2. Anatomical features of the species studied

Anatomical features	M. graminifolia	M. pentaphylla	M. rigidula	M. tenuifolia
Leaf midrib	Slightly convex to	Biconvex	Biconvex	Straight on the adaxial
	convex			surface and convex on
				the abaxial surface
Angular collenchyma on the adaxial side of the midrib	Present	Present	Present	Absent
Accessory vascular bundles in the midrib	Absent	Present	Present	Absent
Leaf wing	NS	Arched	Flat	NS
Papillae on the abaxial surface of the leaf blade	Absent	Present	Present	Present
Epicuticular wax pattern on the abaxial surface of the leaf	$NS^*$	Membranous plates	Membranous plates	Irregular plates
blade				
Type of mesophyll	Isobilateral	Dorsiventral	Dorsiventral	Dorsiventral
Petiole outline	Concave-convex	Cylindrical	Cylindrical	Cylindrical
Pericyclic fibers	Thickened	Thin	Thickened	Thin
Number of vascular bundles in the petiole	Five	Six	Six	Four
Two types of cell in the stem medulla	NS	Present	Absent	NS

\*NS: character not seen.



Figure 1. Fertile branch of *Manihot graminifolia*.



Figure 2. Map showing the geographical distribution of *Manihot graminifolia*.



**Figure 3.** Cross-section of the stem, petiole, and leaf blade. A, C, C1, D, *Manihot graminifolia*. B, E, E1, F, *Manihot tenuifolia*. G, I, K, M, P, *Manihot pentaphylla*. H, J, L, N, O, *Manihot rigidula*. A, slightly convex to convex midrib, with one vascular bundle and angular collenchyma (Cg) on the adaxial surface. B, midrib straight on the adaxial surface and convex on the abaxial surface, with one vascular bundle. C, petiole with concave-convex outline and six vascular bundles. C1, pericyclic fibers with thick cell walls. D, abaxial epidermis of leaf composed of epidermal cells (ep) and isobilateral mesophyll. E, cylindrical petiole with five vascular bundles. E1, pericyclic fibers with thin cell walls. F, abaxial epidermis of leaf composed of papillose cells and dorsiventral mesophyll. G, H, cylindrical petiole with six vascular bundles. I, J, biconvex midrib, angular collenchyma on the adaxial surface, a main vascular bundle (Fp) and an accessory vascular bundle (circle). K, L, abaxial epidermis of leaf with papillose cells and dorsiventral mesophyll. M, arched leaf wing. N, flat leaf wing. O, medullary parenchyma of the stem formed by two cell types. P, medullary parenchyma of the stem formed by one cell type. Palisade parenchyma (PP); spongy parenchyma (PE); medulla (M). Scale bars: 500 μm (A, B, C, E, G–J); 100 μm (C1, D, E1, F, K, L); 1000 μm (M–P).



**Figure 4.** *Manihot pentaphylla*. A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, pistillate bract. I, pistillate bracteole. J, pistillate bud. K, pistillate flower. L, fruit. M, seed, dorsal side. N, seed, ventral side.



**Figure 5.** *Manihot pentaphylla*. A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, side view. F, pistillate flower. G, fruit. H, seeds. I, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax pattern. J, habitat. Scale bar =  $5 \mu m$ . Photographs taken by Elifalete Serafim Azevedo.



Figure 6. Map showing the geographical distribution of *Manihot pentaphylla*.



**Figure 7.** *Manihot rigidula.* A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, stamen. I, pistillate bract. J, pistillate bracteole. K, pistillate bud. L, pistillate flower. M, fruit. N, seed, dorsal side. O, seed, ventral side.



**Figure 8.** *Manihot rigidula*. A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, side view. F, pistillate flower. G, fruit. H, seeds. I, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax pattern. J, habitat. Scale bar =  $5 \mu m$ . Photographs taken by Elifalete Serafim Azevedo.



Figure 9. Map showing the geographical distribution of *Manihot rigidula*.



**Figure 10.** *Manihot tenuifolia*. A, fertile branch. B, inflorescence. C, staminate bract. D, staminate bracteole. E, staminate bud. F, staminate flower. G, staminate flower with calyx split and open. H, pistillate bract. I, pistillate bracteole. J, pistillate bud. K, pistillate flower. L, pistillate flower with calyx split and open. M, fruit. N, seed, ventral side. O, seed, dorsal side.



**Figure 11.** *Manihot tenuifolia.* A, habit. B, aspect of foliage. C, detail of inflorescence. D, staminate flower, front view. E, staminate flower, front view. F, pistillate flower, side view. G, pistillate flower, front view. H, fruit. I, seed. J, scanning electron microscopy of the abaxial face of the leaf lobe showing the epicuticular wax pattern. J, habitat. Scale bar =  $5 \mu m$ . Photographs taken by Elifalete Serafim Azevedo.



Figure 12. Map showing the geographical distribution of *Manihot tenuifolia*.

# 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo confirmou caracteres anatômicos com valor taxonômico já citados na literatura: no pecíolo (contorno e número de feixes vasculares), nervura central (contorno e número de feixes vasculares) e lâmina foliar (tipo de mesofilo, células papilosas na face abaxial, distribuição e tipo de estômatos e padrão de cera epicuticular).

Além destes caracteres, a forma da lâmina foliar (se arqueada ou reta) e do bordo (revoluto ou não revoluto), distribuição de tecido colenquimático na nervura central (presente ou ausente na face adaxial), conformação da cutícula (se lisa ou ornamentada), fibras gelatinosas e presença ou ausência de estrias cuticulares aqui observadas, também forneceram informações importantes para diferenciar os táxons.

Morfologicamente, os táxons revelaram diferenças em caracteres conservados e úteis na diferenciação de táxons no gênero, tais como: forma e integridade das brácteas e bractéolas, tipo de inflorescência, hábito e orientação de crescimento.

Após análise dos dados morfógicos e anatômicos, concluímos que os táxons aqui estudados são espécies distintas. Dessa forma, acreditamos que a anatomia de órgãos vegetativos são fontes de dados adicionais, que aliados aos estudos botânicos possibilitam uma classificação taxonômica mais segura, até mesmo, de táxons de difícil delimitação.

Contudo, nota-se, que os estudos anatômicos em *Manihot* ainda são escassos, se considerarmos sua diversidade. Desse modo, uma vez que, este estudo se mostrou importante na caracterização e delimitação das espécies e devido o gênero possuir plasticidade fenotípica, acreditamos que os estudos anatômicos devem ser utilizados, permitindo o levantamento de caracteres diagnósticos úteis na delimitação taxonômica das espécies.