



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
CAMPUS II – AREIA-PB

AMANDA DE SOUZA SANTOS

BIOLOGIA REPRODUTIVA E CITOGÊNETICA DE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE
Croton L. (Euphorbiaceae)

Areia, 2016

AMANDA DE SOUZA SANTOS

BIOLOGIA REPRODUTIVA E CITOGÉNÉTICA DE ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE
Croton L. (Euphorbiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Leonardo Pessoa Felix
Co-orientadora: Dr^a. Laís Angélica de Andrade Pinheiro Borges

Areia, 2016

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237b Santos, Amanda de Souza.

Biologia reprodutiva e citogenética de espécies simpátricas de croton l. (Euphorbiaceae) / Amanda de Souza Santos. - Areia:UFPB/CCA, 2016.
91 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.

Coorientação: Laís Angélica de Andrade Pinheiro Borges.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Biodiversidade. 2. Fenologia. 3. Isolamento reprodutivo. 4. Heterocromatina. I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Borges, Laís Angélica de Andrade Pinheiro. III. Título.

UFPB/BC

CDU 574.1(043.3)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
CAMPUS II – AREIA-PB**

**TÍTULO: “BIOLOGIA REPRODUTIVA E CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DE *Croton* L. (Euphorbiaceae)”**

AUTOR: AMANDA DE SOUZA SANTOS

JULGAMENTO

CONCEITO: *Aprovado*

EXAMINADORES:

Dr. Leonardo Pessoa Felix
Presidente da comissão examinadora

Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho
Examinador externo

Dra. Maria de Fátima Agra
Examinador interno

Areia - PB, 29 de fevereiro de 2016

A meus pais: Maria da Penha de Souza Santos e Benedito Gomes dos Santos,
e meus irmãos: Armando de Souza Santos e Adriana de Souza Santos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Dedico meus primeiros agradecimentos a Deus, a quem sempre busco nas horas de desespero e dúvidas, pedindo calma e sabedoria. Sem a fé de que conseguiria levar todas as dificuldades não teria conseguido.

Agradeço especialmente a meu orientador, o professor Leonardo Pessoa Felix, por todos os ensinamentos e paciência, principalmente por ter me aceitado como sua orientanda, e estar sempre à disposição, abrindo as portas de sua casa sempre que precisei. Não menos importante, agradeço a professora Laís Angélica Borges, por ter me apresentado ao meu orientador, e ter me co-orientado tão bem nesses dois anos, que passaram muito rápido. Aos dois, muito obrigada pela paciência e por terem acreditado que conseguiria dar conta do trabalho, mesmo com quase um ano a menos para realizá-lo.

Agradeço imensamente ao pessoal do Laboratório de Citogenética Vegetal, por terem me acolhido tão bem, e me fazerem sentir em casa sempre que estava com vocês. Agradeço especialmente à Bruno, Angeline e Sarah, por terem me ajudado inúmeras vezes nas técnicas e práticas de laboratório, e principalmente pelas divertidas conversas, brincadeiras e café. Destaco também um agradecimento a Joel por ter me ajudado tão solícitamente nessa fase final, e a Saulo por todas as exsicatas sequinhas e bem cuidadas.

Também agradeço a meus amigos de turma, foi um enorme prazer conhecer todos vocês, Lucinalva, Larisse, Thais e Marcelo, e os demais. E desde já agradeço a todos os meus amigos, que de alguma forma sempre me deram força e apoio quando necessário, os represento nas pessoas de Sibelle e Edilaine, amigas pra toda a vida.

Agradeço infinitamente à meus pais Benedito e Maria da Penha, sem o apoio, paciência e amor de vocês desde o início de minha vida, jamais teria chegado tão longe, e jamais conseguiria continuar meu caminho. Aos meus irmãos Armando e Adriana, pelas ideias, apoio, e suporte que foram imprescindíveis, e principalmente as caronas para casa.

Aos meus primos Fabiano e Itatiane, sem a ajuda de vocês jamais teria conseguido cumprir minhas atividades e viagens de campo com tanta rapidez e eficiência.

E por fim, e não menos importante, agradeço a CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, pelo consentimento da bolsa de estudos e todo o apoio, sem isso não teria conseguido executar esse trabalho.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos sonhos”.

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

O gênero *Croton* frequentemente apresenta-se nas comunidades vegetais com diversas espécies simpátricas sem clara evidência de hibridização interespecífica. Com o objetivo de avaliar a existência de barreiras de isolamento reprodutivo e o potencial de hibridização entre essas espécies, foram avaliados diferentes aspectos da biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de *Croton* (*C. heliotropiifolius*, *C. jacobinensis* e *C. urticifolius*), em três populações diferentes, por meio de mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (sincronia de floração, biologia floral e visitantes florais de cada espécie), como pós-zigóticos (formação de sementes após experimentos de polinização controlada e análises citogenéticas). Além disso, foram analisados também os cariótipos de mais 12 espécies do gênero, e levantados todos os números cromossômicos previamente conhecidos, e analisados num contexto filogenético, a fim de identificar o número básico ancestral. A fenologia reprodutiva das espécies variou entre as populações, porém foi possível observar um grau significativo de sincronia floral das espécies dentro das populações. Há o compartilhamento de polinizadores entre elas, sendo os visitantes mais frequentes: *Apis* sp., e *Trigona* sp., que visitam as flores à procura de néctar. São autocompatíveis, com formação elevada de frutos, sem diferenças significativas com relação à formação de frutos naturais e intraespecíficos. Esses resultados apontam fracas barreiras reprodutivas pré-zigóticas para essas espécies simpátricas de *Croton*. Por outro lado, essas espécies são intercompatíveis com formação de frutos interespecíficos, o que sugere a ocorrência de uma barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótica incompleta, possibilitando a formação de híbridos interespecíficos. As três espécies também apresentam número cromossômico $2n = 20$, mas com diferentes padrões de heterocromatina. Diferenças cariotípicas em número e estrutura cromossômica geralmente constituem eficientes barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico. Esses resultados associados com o estudo da germinação das sementes ainda em andamento, sugerem a necessidade de uma melhor investigação nas barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico para espécies simpátricas de *Croton*. Dentre as demais espécies do gênero analisadas citogeneticamente, a maioria também apresentou $2n = 20$, exceto uma população de *Croton pulegioides* ($2n = 22$) e *C. limae* ($2n = \text{ca.}100$). Cinco das espécies analisadas não possuíam registros prévios de contagens cromossômicas: *C. limae* com $2n = \text{ca.}100$, e *C. rudolphianus*, *C. tricolor*, *C. adamantinus*, e *C. grewoides* com $2n = 20$. Todas as espécies apresentaram duas bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ maiores, localizadas nos terminais dos braços curtos de um par cromossômico correspondente a RON, exceto *C. rudolphianus*, *C. urticifolius* e *C. sellowii*, que tiveram a RON proximal. Todas as espécies apresentaram regiões distais de todos os braços cromossômicos (exceto as RONS), fortemente corados com DAPI. As análises de filogenia molecular combinadas com registros de contagens cromossômicas mostraram que o número básico $x = 10$ é o mais provável para o gênero. Embora algumas espécies apresentem números básicos diferentes de $x = 10$, como *C. xalapensis* ($x = 32$), *C. ruizianus* ($x = 8$) e *C. sarcopetalus* ($x = \text{c.}60$), estes números não obtiveram valores significativos de *Proportional Likelihoods* para o número básico ancestral do gênero.

Palavras-chave: Fenologia, isolamento reprodutivo, heterocromatina, número básico.

ABSTRACT

The *Croton* genus often presents itself in plant communities with several sympatric species without clear evidence of interspecific hybridization. Aiming to evaluate the existence of reproductive isolation barriers and potential hybridization between these species, it was evaluated different aspects of the reproductive biology of three sympatric species of *Croton* (*C. heliotropiifolius*, *C. jacobinensis* e *C. urticifolius*), in three different populations, by means of reproductive isolation mechanisms of pre-zygotic (flowering synchrony, floral biology and pollinators of each species), as post-zygotic (seed formation after controlled pollination experiments and cytogenetic analysis). We also analyzed the karyotypes of more 12 species of the genus *Croton*, surveying of all chromosome numbers previously known to the genus, and analyzed in a phylogenetic context in order to identify the ancestral basic number of the genus. The reproductive phenology of species varies among populations; however we observed a significant degree of synchrony floral species within populations. There are sharing of pollinators among them, being the most frequently: *Apis* sp., and *Trigona* sp., that visit flowers looking for nectar. They are self-compatible, with high fruit formation, no significant differences with regard to the formation of natural and intraspecific fruit. These results indicate weak pre-zygotic reproductive barriers for these sympatric species of *Croton*. Moreover, these species are inter-compatible with formation of interspecific fruits, suggesting the occurrence of an incomplete barrier post-zygotic reproductive isolation, allowing the formation of interspecific hybrids. The three species have chromosome number $2n = 20$, with different patterns of heterochromatin. Karyotype differences in numbers and chromosomal structure usually constitute effective barriers to post-zygotic reproductive isolation. These results associated with the seed germination study in progress, suggest the need for further investigation in post-zygotic reproductive isolation barriers for these *Croton* species. Among the other species of the genus analyzed cytogenetically, most presented $2n = 20$ except a population of *Croton pulegioides* ($2n = 22$) and *C. limae* ($2n = \text{ca.}100$). Five of the species analyzed had no previous records of chromosome counts: *C. limae* with $2n = \text{ca.}100$, and *C. rudolphianus*, *C. tricolor*, *C. adamantinus*, and *C. grewioides* with $2n = 20$. Most species presented two heterochromatic bands $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ larger, located in the terminals of the short arms of a chromosome pair corresponding to RON. Whereas in species *C. rudolphianus*, *C. urticifolius* and *C. sellowii*, the RON was proximal. All species have distal regions of all chromosome arms (except the NORs), strongly stained with as DAPI. The analysis of molecular phylogeny combined with records of chromosome counts showed that the basic number $x = 10$ is the most likely for the genus. Although some species showed basic numbers different from $x = 10$, as *C. xalapensis* ($x = 32$), *C. ruizianus* ($x = 8$) and *C. sarcopetalus* ($x = \text{c.}60$), these numbers did not have significant values of *Proportional Likelihoods* to the ancestral basic number of the genus.

Keywords: Phenology, reproductive isolation, heterochromatin, basic number

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Intercompatibilidade entre espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae)

Tabela 1. Índices de sincronia de floração intraespecíficos e interespecíficos de *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*, calculados par a par nas populações Chã de Jardim (1), Tanque Comprido (2) e Gruta de Cobra (3), em Areia, PB, de acordo com os Índices de Augspurger (1983) - AU e Freitas e Bolgrem (2008) - FB.....p.38

Tabela 2. Diâmetro, quantidade de flor por inflorescência e antese floral de espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia, PB.....p.39

Tabela 3. Visitantes florais de espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia, PB e respectivos comportamentos de visita. PO: polinizador, PI: pilhador.....p.40

Tabela 4. Resultados dos experimentos de polinização controlada e natural em três espécies simpátricas de *Croton*, em Areia, PB. IAI: Índice de Autoincompatibilidade (modificado de Zapata e Arroyo, 1978); ER: Eficácia Reprodutiva (modificado de Zapata e Arroyo, 1978).....p.41

Tabela 5. Resultados dos experimentos de polinização cruzada interespecífica entre três espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia-PB.....p.42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Citotaxonomia e evolução cariotípica de *Croton* L.

Tabela 1. Espécies de *Croton* analisadas, organizadas em suas respectivas seções de acordo com van Ee et al. (2001), procedência, material herborizado de referência (Voucher), números cromossômicos (PW), contagens prévias para a espécie de acordo com Lira-Neto (2011) e Pôrto et al. (2014), (PC), tamanho médio, e figuras ilustrativas dos resultados apresentados.....p.66

Tabela 2. Lista de espécies de *Croton*, organizadas de acordo com a classificação de van Ee et al. (2001), usadas na reconstrução do número básico ancestral do gênero, seus números cromossômicos diploides ($2n$ e n), respectivas referências, e código das sequências extraídas no GenBank.....p.67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Intercompatibilidade entre espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae)

Figura 1. Intensidade de floração (em porcentagem) de *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*. **A:** População 1 (Chã de Jardim). **B:** População 2 (Tanque Comprido). **C:** População 3 (Gruta de Cobra). Dados relacionados com a precipitação acumulada do mês.....p.44

Figura 2. Inflorescências com flores pistiladas e botões florais das espécies de *Croton* estudadas. **A:** *C. urticifolius*. **B:** *C. heliotropiifolius*. **C:** *C. jacobinensis*. **D:** Pompilidae visitando flor feminina de *C. jacobinensis*.....p.45

Figura 3. Cromossomos de espécies de *Croton* após coloração com fluorocromos DAPI (Azul) e CMA (Amarelo), seguidas da sobreposição da coloração. **A-C:** *Croton urticifolius*; **D-F:** *C. jacobinensis*; **G-I:** *C. heliotropiifolius*. Cabeças de setas em C apontam bandas DAPI⁺ puntiformes nas regiões intersticiais. Setas em C, F e I apontam bandas CMA⁺. Barra em I equivale a 10μ.....p.46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Citotaxonomia e evolução cariotípica de *Croton* L.

Figura 1. Dupla coloração CMA (amarelo) e DAPI (azul) em espécies de *Croton* secções *Adenophylli* (A), *Geiseleria* (B-C), *Barhamia* (D-E), *Sellowiorum* (F) e *Lasiogyne* (G-J). Todas com $2n = 20$. A. *Croton heliotropiifolius*; B. *Croton adamantinus*; C. *Croton grewioides*; D. *Croton rudolphianus*; E. *Croton urticifolius*; F. *Croton sellowii*; G. *Croton tricolor*; H-J. *Croton jacobinensis* corado com DAPI (H), CMA (I) e CMA/DAPI sobrepostos (J). Setas em G indicam satélites; cabeças de seta em D, E, F, indicam RON proximal; estrelas em E, bandas DAPI puntiformes; barra em J equivale a 10μp.73

Figura 2. Dupla coloração CMA (amarelo) e DAPI (azul) em espécies de *Croton* sect. *Lasiogyne* (B-C) e unplaced (A, D-E). A. *Croton pulegioides* ($2n = 22$, população Jussape); B. *Croton argyrophyllus* ($2n = 20$); C. *Croton blanchetianus* ($2n = 20$); D. *Croton pulegioides* ($2n = 20$, população Campina Grande); E. *Croton* sp1. ($2n = 20$); F. *Croton limae* $2n = ca.100$); G. *Croton* sp2. ($2n = 20$). Setas em A indicam bandas CMA terminais; barra em G equivale a 10μp.74

Figura 3. Evolução cariotípica do gênero *Croton*, baseada nas regiões ITS incorporadas com informações de contagens cromossômicas. Os nomes e posicionamentos dos clados foram organizados de acordo com van Ee et al. (2011).....p.75

Sumário

INTRODUÇÃO	15
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 1.....	21
Intercompatibilidade entre três espécies simpátricas de <i>Croton</i> (Euphorbiaceae)	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Local e espécies do estudo.....	26
Sincronia de floração	26
Biologia floral	27
Visitantes florais	27
Experimentos de polinização controlada e natural	27
Análise citogenética.....	27
Análises estatísticas	28
RESULTADOS	29
Sincronia de floração	29
Biologia floral	29
Visitantes florais	30
Experimentos de polinização controlada e natural	30
Análises citogenéticas.....	31
DISCUSSÃO	32
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 2.....	58

Citotaxonomia e evolução cariotípica de <i>Croton</i> L.....	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAL E MÉTODOS	64
Material Vegetal	64
Preparação cromossômica.....	64
Dupla coloração CMA/DAPI.....	64
Evolução cromossômica	65
RESULTADOS	71
Números cromossômicos e padrão de bandas CMA/DAPI.....	71
Número básico ancestral e evolução cariotípica do gênero <i>Croton</i>	71
DISCUSSÃO	76
AGRADECIMENTOS	79
REFERÊNCIAS.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae possui distribuição pantropical e temperada, com 218 gêneros e 6.745 espécies descritas (Stevens, 2001). No Brasil são encontrados 63 gêneros, sendo quatro endêmicos, e 940 espécies distribuídas nas cinco regiões do país (Cordeiro et al. 2015a). No Nordeste brasileiro foram registrados 50 gêneros e 373 espécies da família (Lucena e Alves, 2010; Cordeiro et al. 2015a).

Euphorbiaceae atualmente encontra-se dividida em quatro subfamílias: Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae (Stevens, 2001). A subfamília Crotonoideae (*Croton* L., *Manihot* Miller, *Jatropha* L., *Codiaeum* A. Juss., *Aleurites* J. R. Forst. & G. Forst., *Cnidoscolus* Pohl, etc.) é o maior taxon que apresenta látex, pólen caracteristicamente poliporado ou inaperturado, com um padrão incomum de exina chamado crotonoide, com tricomas frequentemente estrelados, peltados ou ramificados e látex branco, frequentemente cáustico (Berry et al. 2005; Judd et al. 2009).

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com mais de 1.200 espécies reconhecidas, a maioria delas distribuídas no Novo Mundo, África e Madagascar (Webster, 1993; Berry et al. 2005; Govaerts et al. 2016). É formado por arbustos, subarbustos, árvores, ervas e lianas, frequentemente encontrados em diferentes habitats tropicais e subtropicais (Berry et al. 2005; Secco, 2008; Cordeiro et al. 2015b). No Brasil são reconhecidas 316 espécies do gênero destas 252 endêmicas, 120 delas referidas para a Região Nordeste, a maioria (82 espécies), ocorrem no domínio das Caatingas (Cordeiro et al. 2015b).

Croton pode ser caracterizado por apresentar glândulas na base das folhas, látex aquoso a colorido, com folhas mais velhas alaranjadas antes da senescência, inflorescências estreitas com flores unissexuais, botões das flores masculinas com filetes inflexos na extremidade, e as femininas com pétalas reduzidas (Webster, 1993; Barry et al. 2005; Carneiro-Torres et al. 2011; van Ee et al. 2011). Apresenta uma grande variedade de tricomas, que podem ser simples (glandulares ou não) ou ramificados (estrelados, lepidotos, fasciculados, etc.) com potencial importância para utilização na sistemática do grupo (Lucena e Sales, 2006). O gênero é considerado monofilético e subdividido em 40 secções, das quais 31 são referidas para o Novo Mundo (Webster, 1993), embora apenas 27 secções sejam formalmente reconhecidas como monofiléticas (van Ee et al. 2011).

Croton é um gênero pouco estudado cariológicamente, sendo conhecidos registros numéricos de apenas 42 espécies (Rice et al. 2014), nenhuma delas analisadas através de bandeamento com fluorocromos ou outra técnica de coloração diferencial. Destas, 20 espécies são referidas para os neotrópicos, cobrindo dez das suas 31 secções nessa região, sendo $2n = 16$, 20 e 30 os números cromossômicos mais frequentes (há forte predomínio de $2n = 20$), com $x = 7, 8, 9, 10$ como prováveis números básicos do gênero (Miller & Webster, 1966). Números cromossômicos constituem o parâmetro cariológico mais amplamente empregado para o entendimento da evolução em vegetais (Guerra, 2008). Entretanto, a análise da variação cromossômica em gêneros de plantas com número e morfologia cromossômica estável torna o emprego dessa técnica pouco informativa (ver, por exemplo, Guerra, 1993).

A carência de dados citogenéticos, juntamente com a riqueza do gênero, dificultam a compreensão de mecanismos de evolução, especiação, relações taxonômicas, e oferecem poucos parâmetros comparativos sobre a diversificação evolutiva, radiações adaptativas e inovações, assim como os rearranjos cromossômicos (Berry, 2005; Pôrto, 2007) dessas espécies. O número cromossômico por si só tem pouco significado filogenético e sistemático (Bedini et al. 2012), mas, juntamente com outros fatores, é uma das características citológicas que fornecem informações sobre alterações genéticas envolvidas na evolução de um grupo (Guerra, 1989), como também afinidades de uma espécie com outras (Auler et al. 2006), relações de parentesco próximo, isolamento reprodutivo, fertilidade reduzida de híbridos (Olkosi, 2010), delimitação taxonômica e especiação (Grant, 1989; Pedroza et al. 1999), entre outros.

Várias espécies de *Croton* são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como beiras de estradas, margem de rios e clareiras de matas (Silva et al. 2009). É comum a existência de diferentes espécies do gênero em simpatria, crescendo lado a lado, florescendo na mesma época do ano, mas sem evidência clara de hibridização interespecífica, o que sugere a existência de fortes barreiras de isolamento reprodutivo no grupo (Grant, 1989; Pôrto, 2007).

O isolamento reprodutivo atua fortemente na criação e manutenção de espécies naturais, e acontece principalmente por meio de barreiras reprodutivas, que podem ser pré- ou pós-zigóticas (Gouveia, 2014). Em plantas, esse isolamento se dá principalmente pela interação dos diferentes tipos de barreiras e suas complexidades (Widmer et al. 2009).

De acordo com Ramsey et al. (2003), as barreiras reprodutivas pré-zigóticas se caracterizam por diferenças ecogeográficas, temporais e comportamentais entre as espécies, já as barreiras pós-zigóticas seriam a inviabilidade e esterilidade dos híbridos. Alguns fatores

podem ser apontados por afetarem a intensidade dessas barreiras reprodutivas, como: sobreposição do período de floração, compartilhamento de polinizadores, compatibilidade e viabilidade do grão de pólen, viabilidade e germinação das sementes, entre outros (Ramsey et al. 2003; Gouveia, 2014).

As barreiras reprodutivas pré-zigóticas parecem ser mais efetivas no isolamento reprodutivo do que as barreiras pós-zigóticas, por reduzirem mais efetivamente o fluxo gênico entre as espécies (Ramsey et al. 2003; Widmer et al. 2009). Espécies simpátricas tendem a apresentar mecanismos de isolamento pré-zigótico, a fim de evitar o fluxo gênico entre elas, porém, em populações onde há sobreposição de floração e compartilhamento de agentes polinizadores, as barreiras pré-zigóticas podem ser fracas ou ausentes. Desse modo, o isolamento reprodutivo dessas espécies pode se dar por meio de barreiras pós-zigóticas (Widmer et al. 2009).

A maioria das Euphorbiaceae é polinizada por insetos, como moscas, abelhas, vespas e borboletas, que vão à procura de néctar. A menos que as espécies se adaptem à polinizadores específicos, a fim de evitarem o intercruzamento na população, levando-as ao isolamento reprodutivo por divergência floral (Schemske e Bradshaw, 1999), o cruzamento interespecífico pode ser um problema no estabelecimento de barreiras reprodutivas para espécies simpátricas. Em populações onde há o compartilhamento de polinizadores, as espécies ficam sujeitas à preferência dos polinizadores (Armbruster e Herzig, 1984), além de atraírem muitos visitantes, que podem causar um fluxo gênico de pólen interespecífico como consequência do intenso forrageamento de flores nessas populações (Barrett e Harder, 1996).

Neste trabalho realizou-se um estudo dos diversos aspectos da biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de *Croton*, a fim de avaliar o grau de isolamento reprodutivo e o potencial de hibridização entre elas. Para isso, analisamos tanto mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (sincronia de floração, biologia floral e visitantes florais de cada espécie), como pós-zigóticos (formação de sementes após experimentos de polinização controlada e análises citogenéticas), e identificamos as variações cromossômicas nas três espécies e em mais 12 espécies do gênero, por meio do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI. Além disso, foram levantados todos os números cromossômicos previamente conhecidos para o gênero, analisados num contexto filogenético, com os objetivos de identificar: 1) O número básico do gênero; 2) Possíveis sinapomorfias para grupos taxonômicos infragenéricos; 3) Caracterizar cromossomicamente as espécies analisadas.

REFERÊNCIAS

- Armbruster WS, Herzig AL. 1984. Partitioning and Sharing of Pollinators by Four Sympatric Species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71(1): 1-16.
- Auler NMF, Battistin A, Reis MS. 2006. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Botucatu, 8(2): 55-63.
- Barrett SCH, Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *TREE* 2(2): 73-79.
- Bedini G, Garbari F, Peruzzi L. 2012. Does chromosome number count? Mapping karyological knowledge on Italian flora in a phylogenetic framework. *Plant Systematics and Evolution – Springer*. DOI 10.1007/s00606-011-0585-1.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92(9): 1520–1534.
- Carneiro-Torres DS, Cordeiro I, Giulietti AM, Berry PE, Riina R. 2011. Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia*, 63(1): 122–132.
- Cordeiro I, Secco R, Cardiel JM, Steinmann V, Caruzo MBR, Riina R, Lima LR de, Maya-L CA, Berry P, Carneiro-Torres DS, Silva OLM, Sales MFd, Silva MJda, Sodré RC, Martins MLL, Pscheidt AC, Athi -Souza SM, Melo ALd, Oliveira LSD, Paula-Souza J, Silva RAP. 2015a. Euphorbiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB113>>. Acesso em: 14 Dez. 2015.
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR de, Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJda, Sodré RC. 2015b. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 27 Jan. 2016.

Govaerts R, Fernández-Casas FJ, Barker C, Carter S, Davies S, Esser HJ, Gilbert M, Hoffmann P, Radcliffe-Smith A, Steinmann V, van Welzen P, Whitmore T. 2016. World Checklist of Euphorbiaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet: <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved 2016-01-20.

Grant V. 1989. Especiación vegetal. Mexico: *Noriega Editores*, 587p.

Gouveia TMZM. 2014. Hibridação e isolamento reprodutivo entre *Epidendrum secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl (Orchidaceae) na Serra dos Órgãos – RJ. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

Guerra M. (1989) Introdução à Citogenética Geral. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*.

Guerra M. 1993. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMADAPI staining. *Heredity* 71: 234-241.

Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Research* 120: 339–350.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3. Ed. Porto Alegre: *Artmed*.

Lucena MFA, Alves M. 2010. Notas taxonômicas para Euphorbiaceae s.l. do Nordeste do Brasil. *Hoehnea* 37(1): 71-85.

Lucena MFA, Sales MF. 2006. Tricomas foliares em espécies de Croton L. (Crotonoideae – Euphorbiaceae). *Rodriguésia* 57 (1): 11-25.

Miller KI, Webster GL. 1966. Chromosome numbers in the Euphorbiaceae. *Brittonia* 18: 372-379. Oct-Dec.

Olkoski D. 2010. Número cromossômico e comportamento meiótico de populações de *Mimosa bimucronata* (DC) O. Kuntze no Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação: Porto Alegre.

Pedroza A, Gitaí J, Silva AEB, Felix LP, Guerra M. 1999. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. *Acta Botanica Brasilica*. 13(1): 49-60.

- Pôrto NA. 2007. Citotaxonomia de espécies do gênero *Croton* L. (Euphorbiaceae: Crotonoideae) ocorrentes no nordeste do Brasil. – Areia: PPGA/CCA/UFPB.
- Ramsey J, Bradshaw Jr HD, Schemske DW. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, 57(7): 1520–1534.
- Rice A, Glick L, Abadi S, Einhorn M, Kopelman NM, Salman-Minkov A, Mayzel J, Chay O, Mayrose I. 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome number. *New Phytologist*, 206: 19–26.
- Schemske DW, Bradshaw Jr HD. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(21): 11910-11915.
- Secco RS. 2008. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico. Coleção Adolpho Ducke. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. 169p.
- Silva JS, Sales MF, Carneiro-Torres DS. 2009. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia* 60 (4): 879-901.
- Stevens PF. (2001 em diante). Angiosperm Phylogeny Website, version 12, July 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>> Acesso em: 14 Dez 2015.
- Van Ee BW, Riina R, Berry PE. 2011. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60 (3): 791–823.
- Webster GL. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793–823.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31–38.

CAPÍTULO 1

A ser submetido para publicação no Journal of Systematics and Evolution

**Intercompatibilidade entre três espécies simpátricas de *Croton*
(Euphorbiaceae)**

Amanda de Souza Santos¹, Laís Angélica Borges², Maria de Fátima Araújo Lucena³,
Leonardo P. Felix⁴

1. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil.

2. Laboratório de Ecologia e Reprodução Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil.

3. Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Herbário CSTR, Avenida Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58700-970, Patos-Brasil.

4. Laboratório de Citogenética Vegetal, Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil. Autor correspondente. Email: lpfelix2@gmail.com

RESUMO

Nesse trabalho foram analisados diversos aspectos da biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de *Croton* (*C. heliotropiifolius*, *C. jacobinensis* e *C. urticifolius*), a fim de avaliar o grau de isolamento reprodutivo e o potencial de hibridização entre elas. Para isso, foram analisados tanto mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (sincronia de floração, biologia floral e visitantes florais de cada espécie), como pós-zigóticos (formação de sementes após experimentos de polinização controlada e análises citogenéticas). A floração das espécies estudadas variou em intensidade nas populações, mas ainda foi observado algum grau de sincronia de floração entre as espécies dentro das populações, apresentando horários similares de antese, e o compartilhamento de polinizadores. As espécies são autocompatíveis, com formação elevada de frutos, e intercompatíveis com formação de frutos interespecíficos. Todas as espécies apresentaram número cromossômico $2n = 20$, porém com distintos padrões de heterocromatina, sugerindo diferenças cromossômicas relacionadas a composição de pares de base e sua distribuição ao longo do cariótipo. Diferenças cariotípicas em número e estrutura cromossômica geralmente constituem eficientes barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico. As três espécies apresentaram formação de frutos nos experimentos de polinização manual interespecífica, sugerindo a ocorrência de uma incompleta barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótica, o que possibilitaria a formação de híbridos interespecíficos.

Palavras-chave: Biologia reprodutiva, sincronia, autocompatibilidade, isolamento reprodutivo.

ABSTRACT

In this study we analyzed various aspects of reproductive biology of three sympatric species of Croton (*C. heliotropiifolius*, *C. jacobinensis* and *C. urticifolius*) in order to evaluate the degree of reproductive isolation and the potential hybridization between them. For that, were analyzed mechanisms of both pre-zygotic reproductive isolation (flowering synchrony, floral biology and pollinators of each species) and post-zygotic (seed formation after controlled pollination experiments and cytogenetic analysis). The flowering of the species studied varied in intensity in populations, but it was still observed some degree of flowering synchrony between species within populations, presenting similar times of anthesis, and the sharing of pollinators. The species are self-compatible with high fruit formation, and intercompatible with formation of interspecific fruits. All species have a chromosome number $2n = 20$, but with distinct patterns of heterochromatin, suggesting chromosomal differences regarding the composition of base pairs and their distribution throughout the karyotype. Karyotype differences in numbers and chromosomal structure usually are effective barriers to post-zygotic reproductive isolation. The three species presented fruit formation in interspecific manual pollination experiments, suggesting the occurrence of an incomplete barrier post-zygotic reproductive isolation, which would allow the formation of interspecific hybrids.

Keywords: Reproductive biology, synchrony, self-compatibility, reproductive isolation.

INTRODUÇÃO

Mecanismos de isolamento reprodutivo atuam fortemente na criação e manutenção de espécies naturais, e ocorrem principalmente por meio de barreiras reprodutivas, que podem ser pré- ou pós-zigóticas (Gouveia, 2014). Em plantas, esse isolamento se dá principalmente pela interação dos diferentes tipos de barreiras e suas complexidades (Widmer et al. 2009). Alguns fatores podem ser apontados por afetarem a intensidade dessas barreiras reprodutivas, como: sobreposição do período de floração, compartilhamento de polinizadores, compatibilidade e viabilidade do grão de pólen, viabilidade e germinação das sementes, dentre outros (Ramsey et al. 2003; Gouveia, 2014).

Alguns autores (*e.g.* Ramsey et al. 2003; Widmer et al. 2009) têm argumentado que as barreiras pré-zigóticas parecem ser mais efetivas no isolamento reprodutivo do que as pós-zigóticas, por reduzirem mais efetivamente o fluxo gênico entre as espécies. Espécies simpátricas tendem a apresentar mecanismos de isolamento pré-zigótico, a fim de evitar o fluxo gênico entre elas. Porém, em populações onde há sobreposição de floração e compartilhamento de agentes polinizadores, as barreiras pré-zigóticas podem ser fracas ou ausentes (Widmer et al. 2009), o que pode induzir a formação de barreiras pós-zigóticas.

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com mais de 1.200 espécies, incluindo arbustos, subarbustos, árvores, ervas e lianas (Webster, 1993; Berry et al. 2005; Stevens, 2015; Cordeiro et al. 2015). A maioria das espécies distribui-se entre América do Sul e Antilhas, África e Madagascar (Webster, 1993; Berry et al. 2005; Judd et al. 2009; Stevens, 2015). É um gênero bastante presente em muitos habitats tropicais e constitui uma significativa parcela na diversidade de plantas (Berry et al. 2005). Várias de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como margens de estradas e rios e clareiras de matas (Silva et al. 2009). É comum a existência de diferentes espécies de *Croton* em simpatria, crescendo lado a lado, florescendo na mesma época do ano, mas sem evidência clara de hibridização interespecífica (não ocorre a formação de tipos morfológicos intermediários), o que sugere a existência de fortes barreiras de isolamento reprodutivo no gênero (Grant, 1989; Pôrto, 2007). Um dos vários tipos de isolamento reprodutivo pós-zigótico é a diferenciação cariotípica de espécies próximas, responsável por irregularidades na meiose e eventual esterilidade total ou parcial do híbrido. Este gênero é pouco estudado cariologicamente, sendo conhecidos registros numéricos para apenas 42 espécies do gênero (Rice et al. 2014), nenhuma delas analisadas através de bandeamento com fluorocromos ou outra técnica de coloração diferencial.

Nesse trabalho realizou-se um estudo dos diversos aspectos da biologia reprodutiva de três espécies simpátricas de *Croton*, a fim de avaliar o grau de isolamento reprodutivo e o potencial de hibridização entre elas. Para isso, analisamos tanto mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos (sincronia de floração, biologia floral e visitantes florais de cada espécie), como pós-zigóticos (formação de sementes após experimentos de polinização controlada e citogenética).

MATERIAL E MÉTODOS

Local e espécies do estudo – O trabalho de campo foi realizado em três populações simpátricas de *Croton heliotropiifolius* Kunth, *C. jacobinensis* Baill e *C. urticifolius* Lam., localizadas no município de Areia, Paraíba: Chã de Jardim (6°57'50" S e 35°44'46" O), sítio Tanque Comprido (6°56'11,86" S e 35°44'13,82" O) e Gruta de Cobra (6°58'37,76" S e 35°45'34,87" O). A população Chã de Jardim tem uma distância de aproximadamente 3,22 Km de Tanque Comprido em linha reta e de 2,0 Km de Tanque Cumprido, consequentemente Tanque Comprido tem uma distância de 5,22 Km de Gruta de Cobra, estando a população Chã de Jardim situada entre essas duas populações. Todas, em ambientes mais ou menos antropizados, como margens de estrada e bordas de matas. São arbustos com até 2 metros de altura, incluídos nas secções *Adenophylli* Griseb. (*C. heliotropiifolius*), *Lasiogyne* (Klotzsch) Baill. (*C. jacobinensis*) e *Barhamia* (Klotzsch) B.W. van Ee (*C. urticifolius*) (van Ee et al. 2011).

Sincronia de floração – Para cada população foram realizadas observações fenológicas quinzenais em 10 indivíduos de cada espécie, entre outubro de 2014 a janeiro de 2016. Foram observadas a porcentagem de flores pistiladas, estaminadas, a porcentagem total de flores em cada planta, e a sincronia de floração utilizando os índices propostos por Augspurger (1983) e Freitas e Bolmgren (2008). O primeiro índice calcula a sincronia a partir dos dados de sobreposição de floração entre indivíduos, enquanto o segundo leva em consideração tanto a sobreposição quanto a intensidade da fenofase. Em ambos os casos, foi calculada a sincronia de floração em cada espécie e entre as espécies de cada população. Dados de precipitação mensal do município foram obtidos do site da AESA (Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba, <http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarMesesChuvamMensais>).

Biologia floral - Inflorescências e botões florais de indivíduos de cada espécie foram coletados e fixados em etanol 70% para análises morfométricas. A antese foi monitorada em botões florais de pelo menos cinco indivíduos de cada espécie, desde a abertura floral até a senescência. A receptividade floral foi testada com o uso de permanganato de potássio (Robinson, 1924).

Visitantes florais - Algumas plantas escolhidas aleatoriamente durante o período de antese, foram monitoradas para registro da composição e comportamento (recurso coletado e contato com as partes reprodutivas das flores). Para cada espécie foram realizadas 10 seções de observação, com média de cinco minutos por observação. Os visitantes foram classificados como polinizadores (se contactavam as partes reprodutivas das flores) e pilhadores (quando coletavam recurso floral sem contatar antera e/ou estigma). Visitantes florais das três espécies foram coletados e sacrificados com o auxílio de acetato de etila, para posterior identificação.

Experimentos de polinização controlada e natural – Foram realizados experimentos de polinização controlada para avaliar o sistema reprodutivo de cada espécie e testar o potencial de hibridização entre elas. Utilizou-se flores de inflorescências previamente ensacadas em estágio de botão para os seguintes tratamentos: (1) autopolinização manual, (2) polinização cruzada intraespecífica, (3) polinização cruzada interespecífica, (4) agamosperma. Em cada tratamento foram utilizadas 10 flores por espécie, totalizando 30 flores para cada tratamento/espécie. Em todos os tratamentos as inflorescências foram mantidas ensacadas para evitar a ação de visitantes florais. Foi calculado o Índice de Autoincompatibilidade (IAI) (razão entre a porcentagem de frutos formados por autopolinização manual e a de frutos formados por polinização cruzada manual (modificado de Zapata e Arroyo, 1978). Valores mais próximos de zero indicam autoincompatibilidade, enquanto valores mais próximos de um indicam autocompatibilidade.

Além dos tratamentos citados anteriormente, inflorescências foram marcadas e deixadas sob condições naturais para avaliar o sucesso reprodutivo em cada espécie. Calculamos a Eficácia Reprodutiva (ER), isto é, a razão entre a porcentagem de sementes formados sob condições naturais e a de frutos formados por polinização cruzada manual (*sensu* Zapata & Arroyo, 1978).

Análise citogenética - Para as análises mitóticas, foram utilizadas pontas de raízes obtidas a partir de três espécimes de cada espécie coletadas nas populações e cultivadas no Jardim Experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. As raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína

(0,002 M) por 20-24 h a 10°C, fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e estocadas em *freezer* a -20°C até posterior análise.

Para a preparação das lâminas, as pontas de raízes foram lavadas em água destilada e digeridas com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka v/v) e 20% pectinase (Sigma) (p/v) por 1 h a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores preparações. Subsequentemente, elas foram descoradas em etanol:ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente e mantidas em etanol absoluto a 10°C *overnight*. Posteriormente, as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com os fluorocromos CMA e DAPI de acordo com Barros e Silva e Guerra (2009). As lâminas foram inicialmente coradas com 10µL de CMA (0,1 mg/ml) por uma hora, o excesso de corante retirado com um jato de água destilada e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram coradas com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora, o excesso de corante retirado, secas ao ar e então, montadas em meio contendo glicerol: tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1). Depois, as lâminas foram envelhecidas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos e as melhores metáfases, fotografadas em microscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5, usando o *software* Axiovision 4.8. Amostras herborizadas de todas as populações analisadas foram depositadas no Herbário EAN.

Análises estatísticas – Para avaliar se houve diferença entre as sincronias de floração intraespecíficas e as interespecíficas, os resultados de sincronia em cada população foram comparados com ANOVA um critério e teste de Tukey a posteriori, ou teste de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori, dependendo da normalidade dos dados e da homogeneidade das variâncias. Para comparar o tamanho de flores estaminadas e pistiladas de cada espécie foi utilizado o teste t de Student ou Mann-Whitney, dependendo da homogeneidade das variâncias. Para avaliar se houve diferença entre os tratamentos de polinização, os resultados de formação de fruto foram comparados por meio de testes de Kruskal-Wallis com teste de Student-Newman-Keuls a posteriori, ou por testes exatos de Fisher. Os testes foram realizados no software BioEstat 5.0, com $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Sincronia de floração – O padrão de floração das espécies estudadas variou de acordo com a população. Na população 1, as espécies floresceram durante todo o período de observação, com diferentes intensidades (Fig. 1.A). Na população 2, a floração das espécies se concentrou em seis meses, fevereiro a julho de 2015 (Fig. 1.B). Na população 3, a floração de *Croton urticifolius* e *C. jacobinensis* se concentrou em cinco meses, fevereiro a junho de 2015 (Fig. 1.C), enquanto *C. heliotropiifolius* só emitiu as primeiras flores pistiladas em janeiro de 2016, permanecendo inativa durante as outras observações.

Os padrões de sincronia de floração intra- e interespecífica de *C. urticifolius* e *C. jacobinensis* variaram apenas de acordo com a população, ou seja, os dois índices utilizados indicaram os mesmos padrões (Augspurger, 1983 e Freitas e Bolmgren, 2008, Tabela 1). Ambas as espécies floresceram sincronicamente com as outras duas espécies co-ocorrentes nas populações 1 e 2. Na população 3, *C. urticifolius* apresentou maior sincronia intraespecífica do que interespecífica e *C. jacobinensis* floresceu em sincronia com *C. urticifolius*, mas apresentou baixa sincronia com *C. heliotropiifolius*. Os padrões de sincronia de floração de *C. heliotropiifolius* variaram tanto de acordo com a população, quanto com o índice utilizado (Tabela 1). Na população 1, de acordo com o índice de Augspurger, a espécie foi igualmente sincrônica com as outras duas espécies avaliadas, mas de acordo com o índice de Freitas e Bolmgren, a sincronia intraespecífica foi maior do que a interespecífica. Na população 2, ambos os índices mostraram maior sincronia intraespecífica e na população 3 o índice de Augspurger indicou maior sincronia intraespecífica, enquanto o índice de Freitas & Bolmgren indicou sincronia intraespecífica igual à sincronia de floração interespecífica com *C. urticifolius*.

Biologia floral – As espécies estudadas são monoicas e cada inflorescência possui de quatro a seis vezes mais flores estaminadas do que pistiladas (Tabela 2). Apesar de menos numerosas, flores pistiladas foram maiores do que as estaminadas nas três espécies (Tabela 2; $U = 0$, $p < 0.0001$ em *C. urticifolius*; $t = -5.5427$, $p < 0.0001$ em *C. jacobinensis*; e $U = 0$, $p < 0.0001$ em *C. heliotropiifolius*). As flores são abertas e tanto estames como estigmas ficam facilmente expostos aos visitantes florais. Em cada inflorescência, primeiramente ocorre a abertura das flores pistiladas e, após a antese dessas flores, abre-se uma parte das flores estaminadas por dia, seguindo da base para o ápice da inflorescência. Todas as flores produzem néctar nessas espécies.

A antese floral é diurna e a abertura das flores tem início no mesmo horário nas três espécies (Tabela 2). As flores podem demorar mais para abrir em dias chuvosos e, conseqüentemente, demorar mais para se tornarem receptivas aos visitantes. As flores pistiladas ficam abertas até cinco dias ou até serem polinizadas. As estaminadas ficam abertas por um dia, em seguida murcham e caem, à medida que novas flores se abrem. A deiscência das anteras ocorre junto com a abertura do botão floral nas três espécies e a receptividade estigmática inicia-se cerca de uma hora mais cedo em *C. jacobinensis* e uma hora mais tarde em *C. heliotropiifolius* (Tabela 2).

Visitantes florais – Abelhas dos gêneros *Apis* e *Trigona* foram as únicas espécies observadas visitando ambos os tipos de flores das três espécies de *Croton* estudadas (Tabela 3), e também foram os visitantes observados com maior frequência. Algumas espécies de moscas visitam tanto *C. urticifolius* como *C. heliotropiifolius* e algumas espécies de vespas visitam *C. urticifolius* e *C. jacobinensis*, as quais também compartilharam espécies de borboletas como polinizadores. *Croton jacobinensis* também foi frequentemente visitada por vespas Pompilidae (Fig. 2.D), as quais também atuaram como polinizadores. A única espécie identificada como pilhadora foi uma espécie de formiga que visitou as flores femininas de *Croton urticifolius*. Por serem muito pequenas, essas formigas alcançavam o disco nectarífero da flor pelas laterais, nunca contatando os estigmas (Tabela 3).

Todas as espécies classificadas como polinizadores contatavam pistilo e estigmas, geralmente em busca de néctar, e só deixavam uma inflorescência após visitarem praticamente todas as flores abertas, carregando pólen pelo corpo inteiro. Essas visitas duravam cerca de um minuto por inflorescência. Alguns polinizadores realizaram visitas mais rápidas, durando menos de 30 segundos por inflorescência. Foi o caso da espécie de Lepidoptera observada, que coletava néctar, voava muito rapidamente e, por possuir pernas relativamente longas em comparação ao tamanho das flores, muitas vezes acabava não entrando em contato direto com as partes reprodutivas da flor.

Experimentos de polinização controlada e natural – As três espécies estudadas formaram frutos com sementes em todos os tratamentos de polinização, exceto por agamospermia (Tabelas 4 e 5). A formação de frutos por autopolinização manual, polinização cruzada intraespecífica e polinização natural foi bastante elevada, não havendo diferença significativa entre esses tratamentos em cada espécie (Tabela 4). Tanto o Índice de Autoincompatibilidade, quanto a Eficácia Reprodutiva foram altos, com valores próximos de um (Tabela 4).

A formação de frutos com sementes após polinizações cruzadas interespecíficas (Tabela 5) mostraram que, pelo menos artificialmente, houve hibridização entre as espécies, embora a quantidade de frutos tenha sido menor em comparação com a de frutos formados por polinização cruzada intraespecífica (testes exatos de Fisher com $p = 0.0000$ em todas as espécies). Comparando-se o papel de cada espécie como doadora ou receptora de pólen para a formação de frutos por cruzamentos interespecíficos, observamos que não houve sucesso diferencial entre esses papéis em *C. urticifolius* (teste exato de Fisher com $p = 0.3020$) e *C. heliotropiifolius* (teste exato de Fisher com $p = 0.0509$). Apenas *C. jacobinensis* apresentou diferença nesse parâmetro, formando mais frutos interespecíficos como doadora do que como receptora de pólen (teste exato de Fisher com $p = 0.0010$). Nas espécies *Croton urticifolius* e *C. jacobinensis*, todos os frutos interespecíficos perdidos foram abortados, em *C. heliotropiifolius* as flores pistiladas murcharam e caíram sem formar frutos. Para o teste de agamospermia, apenas *C. urticifolius* produziu frutos, porém sem sementes, nas outras espécies, as flores pistiladas murcharam e caíram após alguns dias.

Análises citogenéticas - Todas as espécies analisadas citogeneticamente apresentaram $2n = 20$, cariótipos simétricos, exibindo cromossomos principalmente metacêntricos e, mais raramente submetacêntricos, com tamanhos médios de $2,74\mu\text{m}$ em *Croton urticifolius*, $2,32\mu\text{m}$ em *C. jacobinensis*, e $2,93\mu\text{m}$ em *C. heliotropiifolius*.

Quanto à composição e localização da heterocromatina (Fig. 3), todas as espécies apresentaram bandas heterocromáticas ricas em GC (CMA^+) e AT (DAPI^+). Foi visualizado um par de bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ grandes, correspondentes às RONS., localizadas no terminal do braço curto de *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*, enquanto *C. urticifolius* apresentou heterocromatina CMA proximal (Fig. 3.C). Além dessas bandas maiores, pequenas bandas CMA menores foram detectadas nos terminais de pelo menos dois pares cromossômicos de *C. heliotropiifolius* (Fig. 3.I). Bandas $\text{CMA}^-/\text{DAPI}^+$ foram observadas na maioria dos terminais cromossômicos de todas as espécies, exceto *C. jacobinensis*. Contudo, nesta espécie, ambos os braços cromossômicos, exceto a RON se apresentaram mais intensamente coradas com DAPI do que com CMA, enquanto a região proximal foi mais intensamente corada com CMA. Por outro lado, bandas DAPI^+ puntiformes foram observadas nas regiões intersticiais e proximais em *C. urticifolius*.

DISCUSSÃO

Embora a literatura não indique qualquer evidência clara de hibridização interespecífica em *Croton*, sugerindo a existência de fortes barreiras de isolamento reprodutivo no gênero (Grant, 1989; Pôrto, 2007), os resultados do presente trabalho indicam o contrário: a princípio, espécies pertencentes a seções diferentes são intercompatíveis e não apresentam fortes barreiras de isolamento reprodutivo. Observamos alta sincronia de floração entre as espécies, antese no mesmo período, compartilhamento de polinizadores, além da formação de sementes por cruzamentos interespecíficos.

A sobreposição e sincronia de floração encontradas nas espécies *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius* nas três populações investigadas podem apontar uma série de efeitos positivos ou negativos para o sucesso reprodutivo dessas espécies. Um efeito observado nessas populações é a atração de muitos agentes polinizadores, que atuam na polinização dessas espécies. Essa grande atração de visitantes irá de alguma forma garantir a polinização, mas, por outro lado, pode acabar promovendo a transferência de pólen entre flores do mesmo indivíduo, geitonogamia (Barrett e Harder, 1996), ou mesmo a transferência de pólen interespecífico que promoveria hibridização entre espécies com fracas barreiras reprodutivas (Widmer et al. 2009). O compartilhamento de polinizadores entre as três espécies de *Croton* foi facilmente observado em campo, por visitantes frequentes (*Apis* sp. e *Trigona* sp.), o que reforça a ideia de transferência de pólen interespecífico entre essas espécies.

O compartilhamento de polinizadores por espécies simpátricas pode acarretar em duas consequências principais: primeiro, elas estão sujeitas à preferência dos polinizadores por determinada espécie ou recurso (Armbruster e Herzig, 1984); segundo, o intenso forrageamento dentro de uma população simpátrica pode acarretar em fluxo de pólen interespecífico (Barrett e Harder, 1996) e, conseqüentemente, pode afetar diretamente a aptidão reprodutiva das espécies, pelo surgimento de híbridos estéreis ou com aptidão reduzida (Armbruster e Herzig, 1984). Esses riscos ao sucesso reprodutivo de espécies simpátricas poderia ser evitado com o surgimento de adaptações na atração de polinizadores específicos, que contribuiriam no surgimento de barreiras de isolamento reprodutivo por divergência floral (Schemske e Bradshaw, 1999).

Um fator para o isolamento reprodutivo de espécies simpátricas sobre a sobreposição e sincronia de floração dessas populações é observado pela dicogamia existente nas espécies de *Croton*. É uma característica do gênero apresentar inflorescência estreita, com flores

unissexuais, onde as flores pistiladas se encontram na base da inflorescência e as flores estaminadas no restante da extensão da inflorescência até as pontas (Webster, 1993). O fato das flores pistiladas abrirem sempre antes das estaminadas classifica essas espécies como protogínicas, com dicogamia interfloral completa dentro das inflorescências (Narbona et al. 2011). Porém, essa dicogamia não pode ser considerada em nível de indivíduo, uma vez que é bastante comum encontrar flores pistiladas e estaminadas abertas ao mesmo tempo em um mesmo indivíduo de *Croton* (Narbona e Dirzo, 2010), o que também foi observado. Essa característica pode facilitar a geitonogamia nas espécies amostradas, que foram capazes de formar frutos após autopolinização manual, sem diferenças significativas entre a formação de frutos por polinização cruzada intraespecífica e formação natural. A autocompatibilidade polínica pode ser comum no gênero *Croton*, já que *Croton sonderianus* Müll.Arg., também se mostrou autocompatível (Leite e Machado, 2010). A autocompatibilidade associada à sobreposição de flores pistiladas e estaminadas no mesmo indivíduo pode ser um dos fatores responsáveis pela alta produção de frutos por formação natural.

A sobreposição e sincronia floral dessas espécies simpátricas de *Croton* pode favorecer também o cruzamento interespecífico, apesar de não haver evidências de morfotipos intermediários entre elas. A formação de frutos com sementes a partir de cruzamentos entre essas espécies, embora significativamente mais baixa em relação à formação de frutos por autopolinização manual, cruzamentos intraespecíficos e polinização natural, favorece esta hipótese. Curiosamente, as espécies estudadas pertencem a diferentes seções, sendo *Croton jacobinensis* inserida no subgênero *Adenophylli*, e as outras duas espécies, no subgênero *Geiseleria* (*sensu* van Ee et al. 2011). Embora todos os cruzamentos interespecíficos tenham proporcionado a formação de sementes, a viabilidade e germinação dessas sementes ainda estão sendo testadas (Santos, em preparação). Só após essa etapa será possível avaliar seu vigor híbrido.

O gênero *Croton*, embora apresentando amplo predomínio de $2n = 20$ (Rice et al. 2014), apresentou padrões de bandas CMA claramente distintos nas três espécies do presente trabalho, sugerindo diferenças cromossômicas relacionadas à composição de pares de base e sua distribuição ao longo do cariótipo. Diferenças cariotípicas em número e estrutura cromossômica geralmente constituem eficientes barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico (Noor et al. 2001; Rieseber, 2001; Guerra, 2008). Entretanto, as três espécies apresentaram formação de sementes nos experimentos de polinização cruzada interespecífica, sugerindo a ocorrência de uma incompleta barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótica, o que possibilitaria a formação de híbridos interespecíficos. Embora a viabilidade das sementes

híbridas ainda não seja conhecida, o registro prévio de pelo menos um indivíduo tetraploide de *Croton heliotropiifolius* na população de Chã de Jardim (Porto et al. 2014), embora aparentemente raro, poderia apresentar uma origem aloploiploide. Espécies poliploides híbridas com cariótipos parentais distintos, como nas três espécies aqui analisadas, contornariam a barreira da esterilidade pela duplicação das cópias dos genomas parentais, ocasionando uma regularidade meiótica no híbrido (Stebbins, 1971). Aloploiploides assim resultantes têm o cariótipo parental reconhecido, como no clássico aloploiploide *Emilia fosbergii* Nicolson (Guerra e Nogueira, 1990; Moraes e Guerra, 2010). Contudo, a análise do cariótipo ilustrado do tetraploide de *C. heliotropiifolius* reportado por Porto et al. (2014), revelou cromossomos com tamanho e morfologia idênticos ao observado para esta espécie na presente amostra, o que não é compatível com uma origem híbrida desse citotipo poliploide.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro. Ao pessoal dos Laboratórios de Citogenética Vegetal e de Ecologia e Reprodução Vegetal da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, pelo suporte técnico, a professora Maria de Fátima Araújo Lucena, da Universidade Federal de Campina Grande, pela identificação das espécies, ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pelo apoio nas coletas de campo.

REFERÊNCIAS

- Augspurger CK. 1983. Phenology, Flowering Synchrony, and Fruit Set of Six Neotropical Shrubs. *Biotropica* 15(4): 257-267.
- Barros e Silva AE & Guerra M. 2009. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH produces. *Biotechnic & Histochemistry*. 99999:1.
- Barrett SCH, Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *TREE* 2(2): 73-79.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. 2005. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92(9): 1520–1534.
- Carneiro-Torres DS, Cordeiro I, Giulietti AM, Berry PE, Riina R. 2005. Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia*, 63(1): 122–132.
- Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR de, Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJda, Sodré RC. 2015. *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 14 Dez. 2015.
- Freitas L, Bolgrem K. 2008. Synchrony is more than overlap: measuring phenological synchronization considering time length and intensity. *Revista Brasileira de Botânica* 31(4): 721-724, out.-dez.
- Gouveia TMZM. 2014. Hibridação e isolamento reprodutivo entre *Epidendrum secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl (Orchidaceae) na Serra dos Órgãos – RJ. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Grant V. 1989. Especiación vegetal. Mexico: *Noriega Editores*, 587p.
- Guerra MS, Maria Tereza M, Nogueira MTM. 1990. The cytotaxonomy of *Emilia* spp. (Asteraceae: Senecioneae) occurring in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 170: 229-236.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2009. Sistemática vegetal: um enfoque filogenético. 3. Ed. Porto Alegre: *Artmed*.

- Lira-Neto AC. 2011. Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Biotecnologia – Recife.
- Lucena MFA, Sales MF. 2006. Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae – Euphorbiaceae). *Rodriguésia* 57 (1): 11-25.
- Moraes AP, Guerra M. 2010. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 287: 113–118.
- Narbona E, Dirzo R. 2010. A reassessment of the function of floral nectar in *Croton suberosus* (Euphorbiaceae): a reward for plant defenders and pollinators. *American Journal of Botany* 97(4): 672–679.
- Narbona E, Ortiz PL, Arista M. 2011. Linking Self-Incompatibility, Dichogamy, and Flowering Synchrony in Two Euphorbia Species: Alternative Mechanisms for Avoiding Self-Fertilization? PLoS ONE 6(6): e20668. doi:10.1371/journal.pone.0020668.
- Noor MAF, Grams KL, Bertucci LA, Reiland J. 2001. Chromosomal inversions and the reproductive isolation of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 12084–12088.
- Pôrto NA, Martins MTCS, Alves LIF, Costa FR, Neves JAL, Bruno RLA, Lucena MFA, Felix LP. 2014. Euphorbiaceae. IAPT/IOPB chromosome data 18. Marhold (ed.) *TAXON* 63 (6), December: 1–33.
- Rieseberg, L.H. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 351-357.
- Robinsohn I. 1924. Die Färbungsreaktion der Narbe, Stigmatochromie, als Morphobiologische Blütenuntersuchungsmethode. Sitzungsberichten Akadenuscher Wissduschaft Wein. *Mathematics* 133: 180-213.
- Santos MJ, Machado IC, Lopes AV. 2005. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 28(2): 361-373, abr.-jun.

Secco RS. 2008. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico. Coleção Adolpho Ducke. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. 169p.

Scopece G, Widmer A, Cozzolino S. 2008. Evolution of Postzygotic Reproductive Isolation in a Guild of Deceptive Orchids. *The American Naturalist* 171(3): 000-000.

Schemske DW, Bradshaw Jr HD. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(21): 11910-11915.

Silva JS, Sales MF, Carneiro-Torres DS. 2009. O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil. *Rodriguésia* 60 (4): 879-901.

Stevens PF. 2014. Angiosperm Phylogeny Website, version 12, July 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>> Acesso em: 14 Dez 2015.

Van Ee BW, Riina R, Berry PE. 2011. A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60 (3): 791–823.

Webster GL. 1993. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793–823.

Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31–38.

Zapata TR, Arroyo MTK. 1978. Plant Reproductive Ecology of a Secondary Deciduous Tropical Forest in Venezuela. *Biotropica* 10(3): 221-230.

Tabela 1. Índices de sincronia de floração intraespecíficos e interespecíficos de *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*, calculados par a par nas populações Chã de Jardim (1), Tanque Comprido (2) e Gruta de Cobra (3), em Areia, PB, de acordo com os Índices de Augspurger (1983) - AU e Freitas e Bolgrem (2008) - FB.

Pop.	Índice de sincronia de floração	<i>Croton urticifolius</i> x				<i>Croton jacobinensis</i> x				<i>Croton heliotropiifolius</i> x			
		<i>C. urticifolius</i>	<i>C. jacobinensis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>	F ou H; p	<i>C. urticifolius</i>	<i>C. jacobinensis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>	F ou H; p	<i>C. urticifolius</i>	<i>C. jacobinensis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>	F ou H; p
1	AU	0.6885a	0.7735a	0.7968a	H=3.9837; p=0.1364	0.7735a	0.7518a	0.8039a	H=1.267; p=0.5307	0.7968a	0.8039a	0.8106a	H=0.1239; p=0.9399
	FB	0.1297a	0.1118a	0.1254a	F=0.7277; p=0.5036	0.1118a	0.1561a	0.1772a	H=3.2852; p=0.1935	0.1254a	0.1772ab	0.2493b	H=11.0968; p=0.0039
2	AU	0.6085a	0.5773a	0.6646a	F=0.8806; p=0.571	0.5773a	0.6561a	0.5737a	F=1.2071; p=0.3149	0.6646ab	0.5737a	0.7294b	F=3.4317; p=0.0458
	FB	0.016a	0.0163a	0.0214a	H=1.0297; p=0.5976	0.0163a	0.0211a	0.0165a	H=3.6568; p=0.1607	0.0214a	0.0165a	0.0877b	H=19.5639; p=0.0001
3	AU	0.8297a	0.6619b	0.1311c	H=23.714; p=0	0.6619a	0.6692a	0.0907b	H=17.3128; p=0.0002	0.1311a	0.0907a	0.5889b	H=18.2903; p=0.0001
	FB	0.0865a	0.0513b	0.0184c	H=25.3006; p=0	0.0513a	0.054a	0.0057b	H=19.3781; p<0.0001	0.0184a	0.0057b	0.0198a	H=19.5639; p=0.0083

Nota: As letras após cada valor indicam comparações par a par entre os valores de sincronia intraespecíficos e interespecíficos obtidos através de cada índice utilizado, em cada população. As comparações foram realizadas por ANOVA (F) ou teste de Kruskal-Wallis (H) e valores seguidos da mesma letra não diferiram significativamente ($p \geq 0.05$).

Tabela 2. Diâmetro, quantidade de flor por inflorescência e antese floral de espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia, PB.

Atributo	<i>Croton urticifolius</i>	<i>C. jacobinensis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>
Diâmetro flor estaminada	3,38 ± 0,32	8,71 ± 1,11	6,19 ± 0,39
Diâmetro flor pistilada	6,56 ± 0,82	10,44 ± 0,84	9,10 ± 1,18
Flor estaminada / inflorescência	71,95 ± 45,79	46,6 ± 16,57	80,95 ± 35,92
Flor pistilada / inflorescência	6,56 ± 0,82	6,15 ± 3,02	12 ± 4,22
Comprimento da inflorescência (cm)	10,73 ± 3,02	8,85 ± 2,7	5,94 ± 1,83
Início da antese floral*	05:00 h	05:00 h	05:00 h
Início da receptividade estigmática*	7:30h	6:30h	8:30h

* Variação de acordo com insolação. Média ± desvio padrão

Tabela 3. Visitantes florais de espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia, PB e respectivos comportamentos de visita. PO: polinizador, PI: pilhador.

Visitantes	<i>Croton urticifolius</i>	<i>C. jacobinensis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>
Diptera (moscas)			
Muscidae spp.	PO		PO
Hymenoptera			
Abelhas			
Apidae			
<i>Apis</i> sp.	PO	PO	PO
<i>Trigona</i> sp.	PO	PO	PO
Vespas			
Pompilidae sp.		PO	
Vespidae			
<i>Polistes</i> sp.	PO	PO	
Sphecidae spp.	PO	PO	
Formigas			
Formicidae sp.1		PO	
Formicidae sp.2	PI		
Lepidoptera (borboletas)			
Lepidoptera spp.	PO	PO	

Tabela 4. Resultados dos experimentos de polinização controlada e natural em três espécies simpátricas de *Croton*, em Areia, PB. IAI: Índice de Autoincompatibilidade (modificado de Zapata e Arroyo, 1978); ER: Eficácia Reprodutiva (modificado de Zapata e Arroyo, 1978).

Espécie	Tratamentos			H	p	IAI	ER
	Autopolinização manual N frutos / N flores	Polinização cruzada N frutos / N flores	Polinização natural N frutos / N flores				
<i>Croton urticifolius</i>	24/30 (80%) a	27/30 (90%) a	29/30 (96.7%) a	1.6233	0.4441	0.89	1.07
<i>C. jacobinensis</i>	26/30 (86%) a	27/30 (90%) a	25/30 (83.3%) a	0.3217	0.8514	0.96	0.92
<i>C. heliotropiifolius</i>	26/30 (86%) a	28/30 (93.3%) a	29/30 (96.7%) a	1.3693	0.5043	0.93	1.03

Nota: As letras após cada valor indicam comparações entre os números de frutos formados em cada tratamento, realizadas através de teste de Kruskal-Wallis (H). Valores seguidos da mesma letra não diferiram significativamente ($p \geq 0.05$).

Tabela 5. Resultados dos experimentos de polinização cruzada interespecífica entre três espécies simpátricas de *Croton* (Euphorbiaceae) em Areia-PB.

Planta doadora de pólen (♂)	Planta receptora de pólen (♀)		
	<i>Croton urticifolius</i>	<i>C. jacobinenis</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>
<i>Croton urticifolius</i>	-	3/30 (10%)	10/30 (33,3%)
<i>C. jacobinenis</i>	9/30 (30%)	-	13/30 (43,3%)
<i>C. heliotropiifolius</i>	6/30 (20%)	3/30 (10%)	-

FIGURAS

Figura 1. Intensidade de floração (em porcentagem) de *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*. **A:** População 1 (Chã de Jardim). **B:** População 2 (Tanque Comprido). **C:** População 3 (Gruta de Cobra). Dados relacionados com a precipitação acumulada do mês.

Figura 2. Inflorescências com flores pistiladas e botões florais das espécies de *Croton* estudadas. **A:** *C. urticifolius*. **B:** *C. heliotropiifolius*. **C:** *C. jacobinensis*. **D:** Pompilidae visitando flor feminina de *C. jacobinensis*.

Figura 3. Cromossomos de espécies de *Croton* após coloração com fluorocromos DAPI (Azul) e CMA (Amarelo), seguidas da sobreposição da coloração. **A-C:** *Croton urticifolius*; **D-F:** *C. jacobinensis*; **G-I:** *C. heliotropiifolius*. Cabeças de setas em C apontam bandas DAPI⁺ puntiformes nas regiões intersticiais. Setas em C, F e I apontam bancas CMA⁺. Barra em I equivale a 10µ.

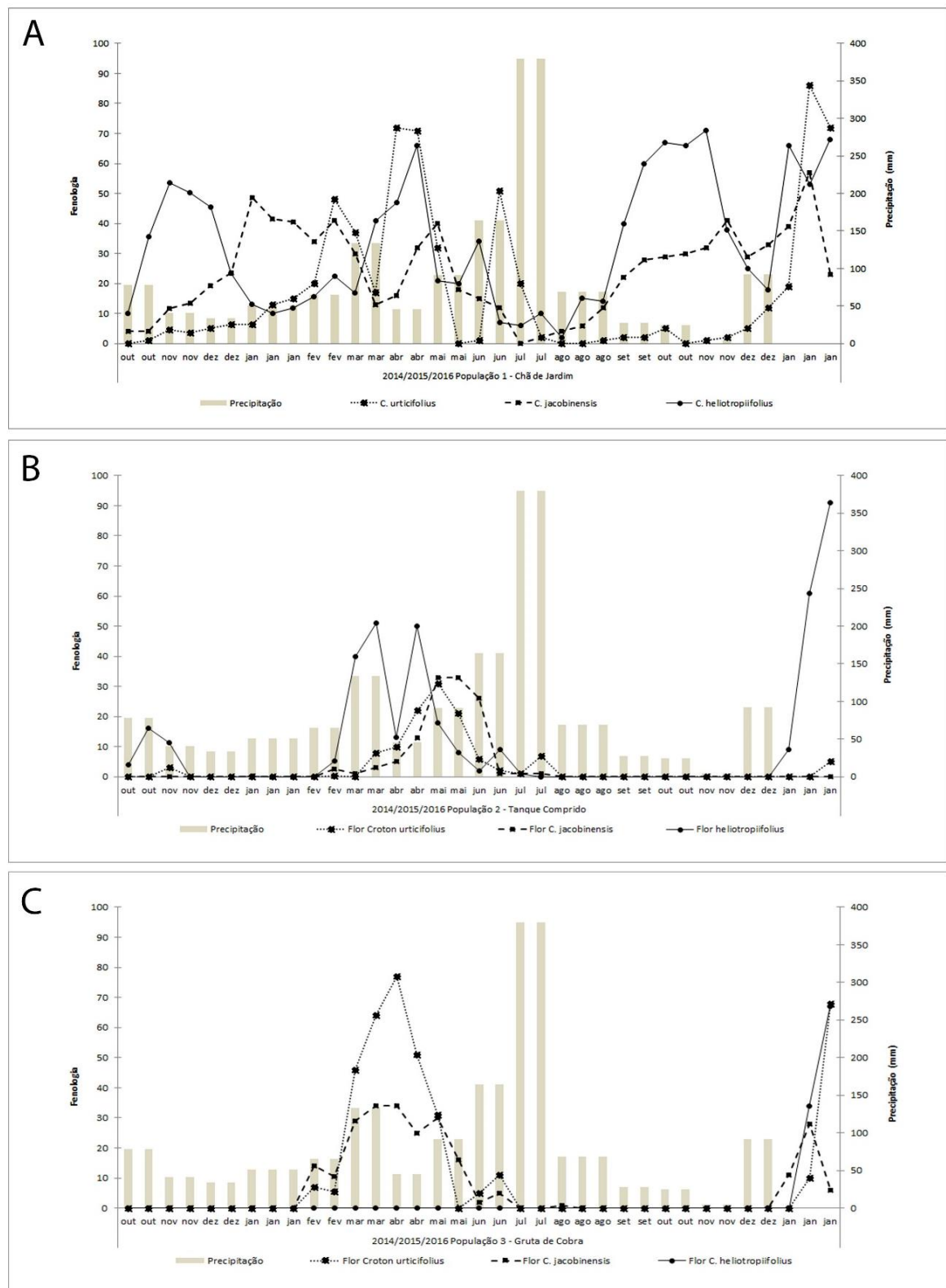


Figura 1. Intensidade de floração (em porcentagem) de *Croton urticifolius*, *C. jacobinensis* e *C. heliotropiifolius*. **A:** População 1 (Chã de Jardim). **B:** População 2 (Tanque Comprido). **C:** População 3 (Gruta de Cobra). Dados relacionados com a precipitação acumulada do mês.

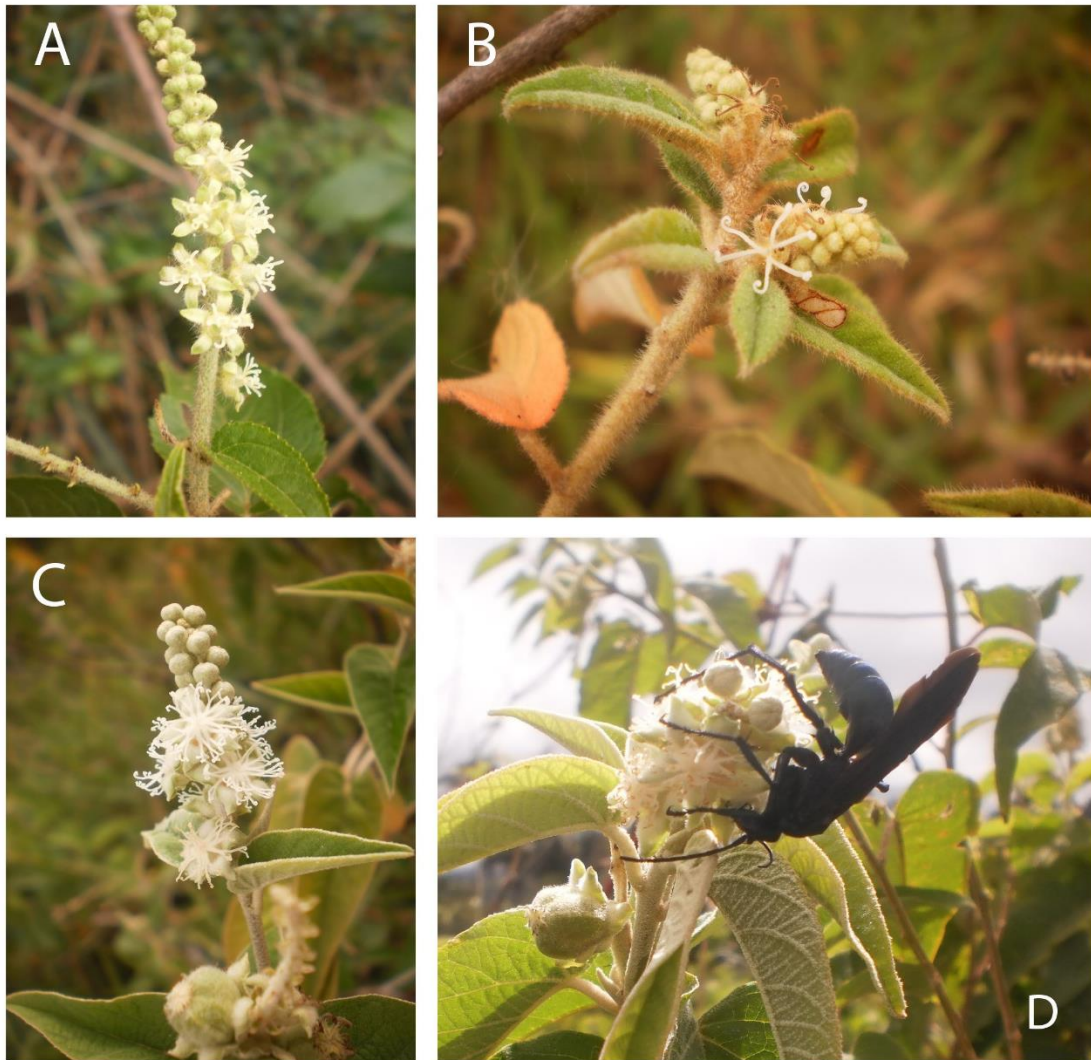


Figura 2. Inflorescências com flores pistiladas e botões florais das espécies de *Croton* estudadas. A: *C. urticifolius*. B: *C. heliotropiifolius*. C: *C. jacobinensis*. D: Pompilidae visitando flor feminina de *C. jacobinensis*.

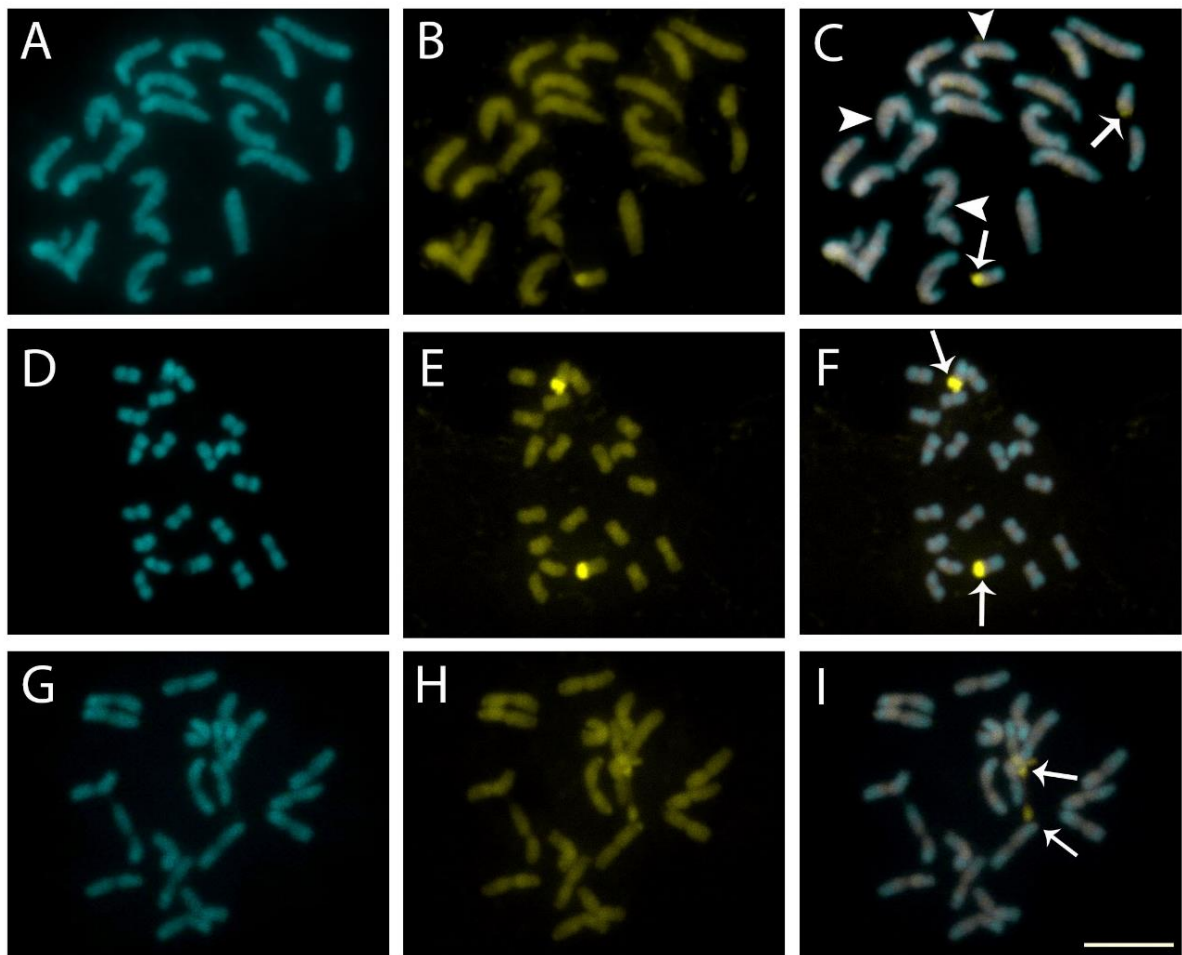


Figura 3. Cromossomos de espécies de *Croton* após coloração com fluorocromos DAPI (Azul) e CMA (Amarelo), seguidas da sobreposição da coloração. A-C: *Croton urticifolius*; D-F: *C. jacobinensis*; G-I: *C. heliotropiifolius*. Cabeças de setas em C apontam bandas DAPI⁺ puntiformes nas regiões intersticiais. Setas em C, F e I apontam bandas CMA⁺. Barra em I equivale a 10 μ .

Journal of Systematics and Evolution

Instructions for Authors

1. MANUSCRIPT SUBMISSION

Thank you for your interest in *Journal of Systematics and Evolution*. Please read the complete Author Guidelines carefully prior to submission, including the section on copyright. To ensure fast peer review and publication, manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review. Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/josae>.

We are looking forward to your submission.

2. EDITORIAL AND CONTENT CONSIDERATIONS

Aim & Scope

Journal of Systematics and Evolution (JSE) is a bi-monthly international English language journal dedicated to the understanding of biodiversity and evolution. Papers in any of the following and related fields will be considered: phylogenetics and phylogenomics, biogeography (including phylogeography), biosystematics, description of well documented new taxa, taxonomic revisions and monographs (incorporating data from morphology, molecules, anatomy and ecology), molecular evolution, evolutionary development, evolutionary ecology, population biology, conservation biology, paleobiology, and related methods and theory.

The Review Process

The acceptance of papers is based on the quality and originality of the research and its significance. The Editors-in-Chief either assign Editors to handle the peer review process or handle the process themselves. All manuscripts are assessed by two or more anonymous reviewers from anywhere in the world. The Editor handling the peer review process makes the final decision on the acceptability of each manuscript based on the reviewers' comments. For most manuscripts, a decision regarding publication will be available in three months. This will take longer when a manuscript requires extensive revision and a second round of review.

We welcome submission of high quality manuscripts on controversial and frontier topics. These manuscripts may be open reviewed; that is, the reviewers' identity will be revealed to authors, and the reviewers are informed that the manuscript is under open review. If necessary, the reviews will be published together with the paper. The editors-in-chief will decide whether a manuscript goes through open review or not.

Manuscripts should be written in a clear, concise, and direct style. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of scientific content, the Editor and the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader. If extensive alterations are

required, the manuscript will be returned to the author for revision.

3. ETHICAL CONSIDERATIONS

The journal retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of animal studies. Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and, where relevant, conform to national guidelines for animal usage in research.

Plagiarism Detection. The journal employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

Committee on Publication Ethics. The journal is a member of, and subscribes to the principles of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#).

Authorship and Acknowledgements. The journal adheres to the [definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#). The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria: i) Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; ii) Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; iii) Final approval of the version to be published; and i) Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under 'Acknowledgements'.

4. PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

Pre-acceptance English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. Visit our site to learn about the options. All services are paid for and arranged by the author. Please note using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

Optimising Your Article for Search Engines

Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimising your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximise the web-friendliness of the most public part of your article.

5. STYLE OF THE MANUSCRIPT

Spelling

The Journal uses the US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the *<Merriam-ebster's Collegiate Dictionary>*.

Units

All measurements must be given in SI (International System of Units) or SI-derived units. Please go to the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website at <http://www.bipm.fr> for more information about SI units.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly—only where they ease the reader's task by reducing repetition of long, technical terms. Initially in the main text use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.

Trade names

Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used.

Scientific names

Authors are requested to check that spelling and authors of scientific names are correct. Authors of plant scientific names should be abbreviated to conform to the International Plant Names Index (IPNI; available at <http://www.ipni.org>) and the Index Fungorum (available at <http://www.indexfungorum.org>). Authors of scientific names should be given once (at first mention) in the text, or in tables. Scientific names of genera, species, subspecies, varieties and forms must be italicized. Genus names should not be abbreviated at the beginning of paragraphs.

Voucher specimens

Voucher specimens should be deposited in a public herbarium, and cited according to the following format: country, political subdivision (typically province or state): locality, collector(s) and number (herbarium acronym). For type indication, the collection date should be included. Please use the herbarium acronyms following Thiers, B. [continuously updated]. Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/>. This format also applies when the material/information is tabulated.

Names of new taxa should be followed by a diagnosis and a full description in English, with the holotype indication. For all type specimens examined by the author(s), an exclamation mark should be given after the herbarium acronym (e.g., PE!). Homotypic names should form a single paragraph, in a chronological sequence, with the respective type indication at the end of each of such paragraphs.

Variables and gene names in italic

Letters and numerals used as a symbol for a gene or allele should ALL be italicized: *trnH* but not *trnH*. Variables should also be set in italic through the manuscript, including in tables, figures, and figure legends.

Nucleotide sequences

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit the sequences to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'.

Addresses are as follows:

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

EMBL Nucleotide Sequence Submissions <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

6. STYLE GUIDELINES FOR PUBLISHING TAXONOMIC RESEARCH

ARTICLES

Please refer to the following guidelines to publish taxonomy research articles.

- Monograph or taxonomic revision of a species complex, genus, family or any taxon of higher rank for extant organisms. Extensive field observation, character analysis and herbarium specimen examination, as well as careful and thorough literature citation will be required to justify any nomenclatural changes involved.
- Description of a new species, genus or any taxon of higher rank for extant organisms. Authors should provide the following to justify their conclusion: (i) careful comparison of as many herbarium specimens of closely related taxa as possible; (ii) extensive data on field observations and laboratory experiments; and (iii) phylogenetic, biogeographic, and/or evolutionary implications of morphological and/or molecular data.
- Description of a new genus or any taxon of higher rank for extinct organisms. Authors should provide the following to justify their conclusion: (i) careful comparison with closely related living taxa; and (ii) phylogenetic, biogeographic, and/or evolutionary implications of well documented morphological data.

7. PARTS OF THE MANUSCRIPT

Manuscripts should be arranged in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgements, (v) references, (vi) tables (each table complete with title and footnotes), (vii) figure legends and (viii) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical material.

Title page

The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) a short running title (less than 50 characters), (iii) the full names of the authors, and (iv) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (v) the full postal and email address, of the author to whom correspondence about the manuscript should be sent.

Authors' names should be presented with given name first and surname last (e.g., Wen-Tsai Wang, Peter H. Raven). Given names should not be shortened to initials unless this is how the author prefers to be known.

The title should be concise, informative and contain the major key words. Do not use any abbreviation in the title. Authors of scientific names should not be included in the title.

Abstract and key words

All research articles should have a brief abstract that states the purpose(s), basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. Review articles should also have an abstract describing the content concisely. The abstract length should be 250 words or fewer. The abstract should not contain any abbreviation or reference.

Four to six key words (for the purpose of indexing) should be listed below the abstract in an alphabetical order.

Text

Authors should use the following sub-headings to divide the sections of the manuscript: Introduction (heading not shown), Material and methods, Results, and Discussion (or Results and Discussion combined).

Acknowledgements

The source of financial support should be acknowledged, including a declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged.

When the research is carried out in areas for which research permits are required (e.g., nature reserves), or when it deals with organisms for which collection or import/export permits are required (e.g., protected species), the authors must describe clearly the process of obtaining these permits in the Acknowledgements section.

References

The Harvard (author, date) system of referencing is used. In the text, give the author's name, with the year followed in parentheses: Wang (1998). If there are two authors use '&': Wang & Raven (2003). When reference is made to a work by three or more authors, the first name followed by "et al." should be used: Wang et al. (2006). Order multiple citations chronologically and then alphabetically: (Iyengar, 1923; Dulberger, 1980; Ornduff, 1980; Wang & Raven, 2003).

All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list. In the reference list, arrange entries in an alphabetical order (by surname). Single author entries precede multi-authored entries by the same first author, regardless of date. Papers with the same first author and multiple other authors should be listed in an alphabetical order by the second author's surname and so on. Cite the names of all authors, regardless of the number of authors for the work. Do not use *ibid.* or *op cit.*

Reference to unpublished manuscripts, unpublished data, personal communications, reports, theses or dissertations (other than Ph.D. theses) should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g., Smith A, unpublished data).

Authors are responsible for the accuracy of the references against the original source. Authors should also cross-check in-text citations against the reference list entries to ensure they agree in spelling and in year.

The following examples show punctuation and style of entries in the reference list.

Journal article

Heath TA, Hedtke SM, Hillis DM. 2008. Taxon sampling and the accuracy of phylogenetic analyses. *Journal of Systematics and Evolution* 48: 239?57.

Qiu Y-L, Li LB, Wang B, Chen ZD, Knoop V, Groth-Malonek M, Dombrowska O, Lee J, Kent L, Rest J, Estabrook GF, Hendry TA, Taylor DW, Testa CM, Ambros M, Crandall-Stotler B, Duff RJ, Stech M, Frey W, Quandt D, Davis CC. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 15511?5516.

Online article not yet published in an issue

An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

Coelho FF, Capelo C, Ribeiro LC, Figueira JEC. 2007. Reproductive modes in *Leiosthrix* (Eriocaulaceae) in South-eastern Brazil: The role of microenvironmental heterogeneity. *Annals of Botany*. doi: 10.1093/aob/mcm289.

Book

Stuessy TF. 1990. *Plant taxonomy: The systematic evaluation of comparative data*. New

York: Columbia University Press.

McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, van Reine WFP, Smith GF, Wiersema JH, Turland NJ eds. 2012. *International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.

Chapter in a book

Hamby RK, Zimmer EA. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ eds. *Molecular systematics of plants*. New York: Chapman & Hall. 50?1.

Wang W-T, Pan K-Y, Li Z-Y. 1990. Gesneriaceae. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*. Beijing: Science Press. 69: 125?81. (The Chinese edition of *Flora of China*)

Wang ZR, He ZR, Kato M. 2013. Athyriaceae. In: Wu Z-Y, Raven PH, Hong D-Y eds. *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 2?: 418?34.

Paper in conference proceedings

Taylor IEP, Wallace JC. 1989. The structural association between cellulose and xyloglucan in the primary cell wall of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Schuerch C ed. *Cellulose and Wood: Chemistry and Technology*. Proceedings of the 10th Cellulose Conference, Syracuse, N.Y., 29 May? June, 1988. New York: John Wiley & Sons. 273?82.

Electronic material

California State Coastal Conservancy. 2000. San Francisco Estuary Invasive *Spartina* Project [online]. Available from www.spartina.org [accessed 13 July 2005].

Ph.D. dissertation

Smith DM. 1967. *Chemical characters as a guide to the taxonomy of Botrychium*. Ph.D. Dissertation. Ann Arbor: University of Michigan.

Tables

Tables should be self-explanatory, and cited in consecutive order in the text with Arabic numerals. Present each table on a separate page with a concise but comprehensible title above. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: ? ? ? ? should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for *P*-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure legends

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensible—the figure and its legend should be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations (in an alphabetical order) and units of measurement. Examples of figure legend style and format:

Figs. 1. The cell and cyst of *Ensiculifera* sp. **1.** An empty cyst from the field, showing the organic spines. **2.** A living cyst in culture. **3.** Thecal plates, lateral view. **4.** Thecal plates, ventral view. **5, 6.** Thecal plates, dorsal view. **7.** Hypotheca, showing the spine of t plate (arrow). **8.** Hypotheca, showing the sulcal plates.

Fig. 1. *Tuomeya Americana* (Küzing) Papenfuss. **A,** Habit of frond. **B,** Part of a frond,

showing shape of whorls. **C**, The cross section through a node showing an axial cell and numerous layers of cortical cells. **D**, Numerous cortical filaments. **E**, Carposporangia. **F**, Apical portion of the branch with an apical cell (arrow). Abbreviations: Ac, axial cell; bc, basal cell; cc, cortical cell; pf, primary fascicle; sf, secondary fascicle.

If a map is used as a figure, the source of base map should always be acknowledged in figure legend.

Figures

All illustrations (line drawings [charts, graphs, maps, phylogenetic trees] and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text with Arabic numerals as, e.g., (Fig. 1), (Fig. 2A), (Figs. 3B, 3C, 4), (Figs. 1–3). Figures or figure plates should be sized to fit within the single column (8.0 cm X 22.5 cm) or the full text width (17.0 cm X 22.5 cm). Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration.

Color figure files should be set up as CMYK (cyan, magenta, yellow, black) and not as RGB (red, green, blue) so that colors as they appear on screen will be a closer representation of how they will print in the journal.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (line art) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: line art: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

More advice on figures can be found at Wiley's guidelines for preparation of figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Appendices

These should be avoided. If absolutely required, they should be placed at the end of the paper, numbered in Roman numerals and referred to in the text.

Supporting Information

Supporting Information is not essential to the article but provides greater depth and background and may include tables, figures, videos, datasets, etc. This material can be submitted with your manuscript, and will appear online, without editing or typesetting. Guidelines on how to prepare this material and which formats and file sizes are acceptable can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

8. PUBLICATION FEES

The journal depends in part on the payment of page charges for its operation. Payment of RMB400 per printed page is required from all authors who have funds available for such purposes. Requests for the waiver of page charges should be submitted to the Editorial Office (jse@ibcas.ac.cn). Manuscripts are accepted or rejected purely on the basis of scientific merit.

JSE will print color figures, but payment of RMB1500 per printed page will be charged

to the author.

A form requesting payment will be sent to the corresponding author prior to printing.

In the event that an author is not able to cover the cost of color figure production in the printed version of the journal, JSE offers an opportunity to reproduce color figures for free in the online version of the article (but black and white figures in the print version). If an author wishes to take advantage of this free service, they should contact the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

9. SUBMISSION REQUIREMENTS

- A cover letter should be included in the 'Cover Letter Field' of the ScholarOne system. The text can be entered directly into the field or uploader as a file.
- The cover letter must contain
 - An acknowledgment that all authors have contributed significantly
 - A statement confirming that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.
 - If tables or figures have been reproduced from another source, the cover letter must include a statement confirming that the authors have permission to reproduce the material and that appropriate acknowledgments have been included in the text.
 - Authors must declare any financial support or relationships that may pose conflict of interest, for more detail refer to the section 'Conflict of Interest Declaration' above.
- Two Word-files need to be included upon submission: A title page file and a main text file that includes all parts of the text in the sequence indicated in the section 'Parts of the manuscript', including tables and figure legends but excluding figures which should be supplied separately.
- The main text file should be prepared using Microsoft Word, doubled-spaced. All pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the first page of the main text file.
- Each figure should be supplied as a separate file, with the figure number incorporated in the file name. For submission, low-resolution figures saved as .jpg or .bmp files should be uploaded, for ease of transmission during the review process. Upon acceptance of the article, high-resolution figures (at least 300 d.p.i.) saved as .eps or .tif files will be required.

10. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted papers will be passed to Wiley's production team for publication. The author identified as the corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Wiley's Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be asked to complete an electronic license agreement on behalf of all authors on the paper. More details on the copyright and licencing options for the journal appear below.

Wiley's Author Services: Tracking your paper's progress

Author Services also enables authors to track their article through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The corresponding author will receive a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit: <http://www.authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

The Accepted Articles service has been designed to ensure the earliest possible circulation of research papers after acceptance. Given that copyright licensing is a condition of publication, a completed copyright form is required before a manuscript can be processed as an Accepted Article.

Accepted articles will be indexed by PubMed; therefore the submitting author must carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript, as it will not be possible to alter these once a paper is made available online in Accepted Article format. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

E-annotation Proof Corrections

Once your paper has been typeset the corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website from which the proof can be downloaded as a PDF. Authors will need to ensure that they have Acrobat Reader version 7.0 or above, or Acrobat Professional in order to use the annotation functionality. This software can be downloaded (free of charge) from the Adobe website. This will enable the file to be opened, read on screen, and any corrections to be added in electronically using the annotation toolbar. Electronic annotations can be used to cross out, replace or insert text, and even insert an attachment (such as a new abstract or figure). Detailed instructions and links to the [Adobe website](#) will be sent with the proof. It is therefore essential that a working e-mail address is provided for the corresponding author.

Proofing

The corresponding author will receive an email with details on how to provide proof corrections. It is therefore essential that a working email address be providing for the corresponding author.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been

incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before allocation to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Offprints

A PDF reprint of the article will be supplied free of charge to the corresponding author. Additional printed offprints may be ordered online for a fee. Within China, please contact the Editorial Office. Outside of China, please click on the following link and fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: <http://offprint.cosprinters.com/cos>. If you have queries about offprints please e-mail: offprint@cosprinters.com.

Author Marketing Toolkit

The [Wiley Author Marketing Toolkit](#) provide authors with support on how to use social media, publicity, conferences, multimedia, email and the web to promote their article.

11. COPYRIGHT, LICENSING AND ONLINE OPEN

Accepted papers will be passed to Wiley's production team for publication. The author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Wiley's Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be asked to complete an electronic license agreement on behalf of all authors on the paper.

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright transfer agreement (CTA), or under open access terms made available via Wiley OnlineOpen.

Standard Copyright Transfer Agreement: FAQs about the terms and conditions of the standard CTA in place for the journal, including standard terms regarding archiving of the accepted version of the paper, are available at: [Copyright Terms and Conditions FAQs](#). Note that in signing the journal's licence agreement authors agree that consent to reproduce figures from another source has been obtained.

OnlineOpen/Wiley's Open Access Option: OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article freely available to all on Wiley Online Library under a Creative Commons license. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made open access. Authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on their personal website, and in an institutional repository or other free public server immediately after publication. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

OnlineOpen licenses. Authors choosing OnlineOpen retain copyright in their article and have a choice of publishing under the following Creative Commons License terms: Creative Commons Attribution License (CC BY); Creative Commons Attribution Non-Commercial License (CC BY NC); Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License (CC BY NC ND). To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the [Copyright Terms and Conditions FAQs](#).

Funder Open Access and Self-Archiving Compliance: Please [click here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access and Self

Archiving Policies, and [click here](#) for more detailed information specifically about Self-Archiving definitions and policies.

12. JSE ONLINE

Visit the *Journal of Systematics and Evolution* home page at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1759-6831](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1759-6831) and <http://www.jse.ac.cn> for more information, and Wiley's web pages for manuscript submission (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp>) and illustration submission (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>) information.

13. EDITORIAL OFFICE ADDRESS

Journal of Systematics and Evolution
Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences
20 Nanxincun, Xiangshan,
Beijing 100093
China
Tel.: +86 10 6283 6572, +86 10 6283 6132
Fax: +86 10 6283 6132
Email: jse@ibcas.ac.cn

CAPÍTULO 2

A ser submetido para publicação na Genetics and Molecular Biology

Citotaxonomia e evolução cariotípica de *Croton* L.

Amanda de Souza Santos¹, Joel Maciel Pereira Cordeiro², Daniela Santos Carneiro-Torres³,
Maria de Fátima Araújo Lucena⁴, Leonardo P. Felix⁵

1. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil. Email: amandas.fev25@gmail.com

2. Laboratório de Citogenética Vegetal, Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil. Email: joelmpcordeiro@yahoo.com.br

3. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, R. José Moreira Sobrinho, s/n, Jequiezinho, Jequié, 45206-190, Bahia, Brazil. Email: dscarneiro@hotmail.com

4. Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Herbário CSTR, Avenida Universitária, s/n, Bairro Santa Cecília, CEP 58700-970, Patos-Brasil. Email: fatimaarar@gmail.com

5. Laboratório de Citogenética Vegetal, Setor Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, 58.397.000, Areia, PB, Brasil. Autor correspondente. Email: lpfelix2@gmail.com

RESUMO

Foram analisados cariótipos de 15 espécies de *Croton*, levantados todos os números cromossômicos previamente conhecidos para o gênero e analisados em um contexto filogenético a fim de identificar o número básico ancestral do gênero. Todas as espécies apresentaram $2n = 20$, exceto uma população de *Croton pulegioides* ($2n = 22$) e *C. limae* ($2n = \text{ca.}100$). Das espécies analisadas, cinco não possuíam registros prévios de contagens cromossômicas: *C. limae*, ($2n = \text{ca.}100$); *C. rudolphianus*, *C. tricolor*, *C. adamantinus*, e *C. grewioides*, ($2n = 20$, respectivamente). Todas apresentaram pelo menos duas bandas heterocromáticas CMA⁺/DAPI⁻ maiores, localizadas na região terminal do braço curto de um par cromossômico correspondente a RON, exceto em *C. rudolphianus*, *C. urticifolius* e *C. sellowii*, com RON proximal. Todas as espécies apresentaram regiões distais de todos os braços cromossômicos (exceto as RONs), fortemente corados como DAPI. As análises de filogenia molecular combinadas com registros de contagens cromossômicas mostram que o número básico $x = 10$ aparece como o mais provável ancestral do gênero. Embora algumas espécies apresentem números básicos diferentes de $x = 10$, como *C. xalapensis* ($n = 32$), *C. ruizianus* ($n = 8$) e *C. sarcopetalus* ($n = \text{c.}60$), estes números não obtiveram valores significativos de *Proportional Likelihoods* para o número básico ancestral do gênero.

Palavras-chave: Citogenética, número básico, heterocromatina, Euphorbiaceae.

ABSTRACT

It was analyzed karyotypes of 15 species of *Croton*, survey of all the chromosome numbers previously known for the genus, and analyzed in a phylogenetics context in order to identify the basic numbers of the genus. All species presented $2n = 20$, except the *Croton pulegioides* population ($2n = 22$) and *C. limae* ($2n = \text{ca.}100$). From the species analyzed, five did not have previous records of chromosome counts: *C. limae*, ($2n = \text{ca.}100$); *C. rudolphianus*, *C. tricolor*, *C. adamantinus*, and *C. grewoides*, ($2n = 20$, respectively). Most of them presented at least two heterochromatin bands $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ larger, located in the terminal region of the short arm of a chromosome pair corresponding to the RON. However, in *C. rudolphianus*, *C. urticifolius* and *C. sellowii*, the RON was proximal. All species have distal regions of all chromosome arms (except the NORs), strongly stained with DAPI. The analysis of molecular phylogeny combined with records of chromosome counts suggests the basic number $x = 10$ as the most likely ancestor of the genus. Although some species chromosome numbers different from $x = 10$, as *C. xalapensis* ($n = 32$), *C. ruizianus* ($n = 8$) and *C. sarcopetalus* ($n = \text{c.}60$), these numbers did not have significant values of *Proportional Likelihoods* to the basic number of the genus.

Keywords: Cytogenetics; basic number, heterochromatin, Euphorbiaceae.

INTRODUÇÃO

Croton L. é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae, com mais de 1.200 espécies reconhecidas, a maioria delas distribuídas no Novo Mundo, África e Madagascar (Webster, 1993; Berry et al. 2005; Govaerts et al. 2016). É formado por arbustos, subarbustos, árvores, ervas e lianas, frequentemente encontrados em diferentes habitats tropicais e subtropicais (Berry et al. 2005; Secco 2008; Cordeiro et al. 2015). São reconhecidas para o Brasil 316 espécies do gênero (252 endêmicas), 120 delas referidas para o nordeste do Brasil, a maioria delas (82 espécies), para o domínio das Caatingas (Cordeiro et al. 2015). O gênero é caracterizado por apresentar glândulas na base das folhas, látex aquoso a colorido, com folhas mais velhas alaranjadas antes da senescência, inflorescências estreitas com flores unissexuais, botões das flores masculinas com filetes inflexos na extremidade, e as femininas com pétalas reduzidas (Webster, 1993, Barry et al. 2005; Carneiro-Torres et al. 2011; van Ee et al. 2011). Apresenta uma grande variedade de tricomas, que podem ser simples (glandulares ou não) ou ramificados (estrelados, lepidotos, fasciculados, etc.) com potencial importância para utilização na sistemática do grupo (Lucena e Sales, 2006). O gênero é considerado monofilético e subdividido em 40 seções, das quais 31 são referidas para o Novo Mundo (Webster, 1993), embora apenas 27 seções sejam formalmente reconhecidas como monofiléticas (van Ee et al. 2011).

O gênero é pouco estudado cariológicamente, sendo conhecidos registros numéricos para apenas 42 espécies (Rice et al. 2014), nenhuma delas analisadas através de bandejamento com fluorocromos ou outra técnica de coloração diferencial. Destas, 20 espécies são referidas para os neotrópicos cobrindo dez das suas 31 seções, sendo $2n = 20$, 16 e 30, os números cromossômicos mais frequentes (há forte predomínio de $2n = 20$), com $x = 7, 8, 9, 10$ como prováveis números básicos para o gênero (Miller & Webster, 1966).

Números cromossômicos constituem o parâmetro cariológico mais amplamente empregado para o entendimento da evolução em vegetais (Guerra, 2008). Entretanto, a análise da variação cromossômica em gêneros de plantas com número e morfologia cromossômica estável, torna o emprego dessa técnica pouco informativa (ver, por exemplo, Guerra, 1993). Nesses casos, a utilização de técnicas de bandejamento com fluorocromos possibilitou o entendimento da evolução cariotípica em diversos grupos de plantas, como nas famílias Orchidaceae (Cabral et al. 2006; Moraes et al. 2012; Oliveira et al. 2015), Amaryllidaceae (Souza et al. 2012) e Solanaceae (Rego et al. 2009). Seu emprego também tem se mostrado bastante útil na separação de espécies próximas como nos gêneros *Citrus* L. (Guerra, 1993;

Carvalho et al. 2005; Brasileiro-Vidal et al. 2007), *Spondias* L. (Almeida et al. 2007), *Epidendrum* L. (Pessoa et al. 2014) e *Ameroglossum* Eb.Fisch., S.Vogel & A.V.Lopes (Mendonça de Almeida et al. submetido). O bandeamento com fluorocromos permite o reconhecimento das regiões heterocromáticas do cromossomo que aparecem como bandas de diferentes colorações, pela adição de dois corantes fluorescentes com diferentes afinidades pelos pares de bases AT ou GC (Guerra, 2000).

A integração de análises cariológicas envolvendo número e bandeamento cromossômico combinados com filogenia através de métodos de reconstrução de caracteres, tem ainda auxiliado no entendimento do significado evolutivo das mudanças cromossômicas num contexto filogenético. Em Araceae, por exemplo, a utilização de números cromossômicos analisados através de Máxima Verossimilhança, demonstrou que a família apresenta um número cromossômico ancestral $x = 16$, ao invés de $x = 7$ ou 14 tradicionalmente propostos (Cusimano et al. 2012). Por outro lado, o emprego dessa mesma técnica para análise das secções *Corniculatae* DC. e *Ripariae* Lourteig da família Oxalidaceae, confirmou os números básicos primários de $x = 5$ e $x = 6$, respectivamente, para as duas secções (Vaio et al. 2013). Na subtribo Pleurothallidinae (Orchidaceae) a utilização das técnicas de reconstrução do estado ancestral com base em análise filogenética, números cromossômicos e bandeamento CMA/DAPI, confirmou o número básico de $x = 20$ para a subtribo e a ocorrência de grandes blocos de heterocromatina proximal como uma sinapomorfia para a subsecção *Pectinata* (Luer) Chiron & van den Berg da secção *Sicariae* (Lindley) Chiron & van den Berg (Oliveira et al. 2015).

Neste trabalho foram analisados os cariótipos de 15 espécies do gênero *Croton* por meio do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI. Além disso, foram levantados todos os números cromossômicos previamente conhecidos para o gênero, analisados num contexto filogenético, com os objetivos de identificar: 1) O número básico ancestral do gênero; 2) Possíveis sinapomorfias para grupos taxonômicos infragenéricos; 3) Caracterizar cromossomicamente as espécies analisadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram analisados o cariótipo de 12 espécies pertencentes a quatro secções de acordo com a classificação de van Ee et al. (2011), além de três espécie registrada como *unplaced* das quais duas espécies estão provisoriamente indeterminadas (Tabela 1). Para todas as amostras foram preparadas exsicatas que se encontram depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN).

Preparação cromossômica

Para as análises mitóticas foram utilizadas pontas de raízes obtidas a partir de plantas cultivadas no Jardim Experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. As raízes foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002 M) por 20-24 h a 10°C, fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por 2-24 h à temperatura ambiente e, estocadas em *freezer* a -20°C até posterior análise.

Para a preparação das lâminas, as pontas de raízes, obtidas como descrito acima, foram lavadas em água destilada e digeridas com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v) por duas horas a 37°C. Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com uma solução de DAPI (2 µg/ml):glicerol (1:1, v/v) para permitir a seleção das melhores preparações. Subsequentemente, elas foram descoradas em etanol:ácido acético (3:1) por 30 min à temperatura ambiente e mantidas em etanol absoluto a 10°C overnight. Então, as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

Dupla coloração CMA/DAPI

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com os fluorocromos CMA e DAPI de acordo com Barros e Silva e Guerra (2010). As lâminas foram inicialmente coradas com 10µL de CMA (0,1 mg/ml) por uma hora, o excesso de corante retirado com um jato de água destilada e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram coradas com 10 µL de DAPI (1 µg/ml) por meia hora, o excesso de corante retirado, secas ao ar e então, montadas em meio contendo glicerol: tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1). Depois, as lâminas foram envelhecidas por três dias

no escuro para estabilização dos fluorocromos e as melhores metáfases, fotografadas em microscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5, usando o *software* Axiovision 4.8.

Evolução cromossômica

Os números cromossômicos foram compilados a partir do Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN), Chromosome Counts Database (CCDB, <http://ccdb.tau.ac.il/>), de trabalhos originais e dos nossos próprios dados. Os nomes científicos confirmados de acordo com o The Plant List (<http://www.theplantlist.org/>) foram mantidos, enquanto nomes não confirmados foram substituídos por nomes válidos, com os nomes previamente publicados indicados entre parênteses (Tabela 2). Sequências de DNAr ITS₁ e ITS₂ de 34 espécies de *Croton* e três espécies de grupos externos (*Astraea lobata* (L.) Klotzsch, *Jatropha curcas* L. e *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.) foram obtidas da base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). De início, as sequências foram alinhadas usando Clustal-W (Thompson et al. 1994) por meio do programa BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999), com ajustes manuais. Em seguida, árvores filogenéticas foram geradas pelo programa MEGA6 v.6.0. (Tamura et al., 2013). Os caracteres evolutivos foram inferidos usando o método Neighbor-Joining (Saitou; Nei, 1987) e a distância evolucionária foi computada usando o método Maximum Composite Likelihood (Tamura; Kumar 2004).

As espécies usadas na análise filogenética tiveram seus números cromossômicos obtidos como descrito acima. Tais informações foram concatenadas e empregadas para a reconstrução do número básico ancestral (x) do gênero *Croton* usando o programa Mesquite v.2.75 (Maddison; Maddison, 2011). As espécies tiveram seus números cromossômicos tratados como dados categóricos e ordenados em oito caracteres de estado referentes ao número cromossômico básico ($x = 8, 9, 10, 11, 14, 18, 32$ e c.60). Foi empregada a função Trace Character History, onde se usou Likelihood Ancestral States com o modelo Markov k-state one-parameter (Mk1), no qual todas as variações são igualmente prováveis. O nome e posicionamento dos clados na árvore filogenética foram baseados em van Ee et al. (2011).

A lista de espécies usadas na reconstrução do número básico ancestral de *Croton*, seus números cromossômicos, respectivas referências, e código das sequências extraídas no GenBank encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 1. Espécies de Croton analisadas, organizadas em suas respectivas seções de acordo com van Ee et al. (2001), procedência, material herborizado de referência (Voucher), números cromossômicos (PW), contagens prévias para a espécie de acordo com Lira-Neto (2011) e Pôrto et al. (2014), (PC), tamanho médio, e figuras ilustrativas dos resultados apresentados.

Taxon	Procedência	Voucher	PW (2n)	PC (2n)	Tamanho médio (µm)	Figura
Sect. <i>Adenophylli</i> Griseb.						
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth	Areia, PB	ASSantos 02	20	40	2,93	1A
Sect. <i>Geiseleria</i> (A. Gray) Baill.						
<i>Croton adamantinus</i> Müll.Arg.	Barra da Estiva, BA	LPFelix 15559	20*	-	1,92	1B
<i>Croton grewoides</i> Baill.	Pesqueira, PE	LPFelix 15650	20*	-	1,22	1C
Sect. <i>Barhamia</i> (Klotzsch) Baill.						
Subsect. <i>Barhamia</i> (Klotzsch) B.W. van Ee						
<i>Croton rudolphianus</i> Müll.Arg.	Buíque, PE	LPFelix 15662	20*	-	3,50	1D
<i>Croton urticifolius</i> Lam.	Areia, PB	ASSantos 04	20	20	2,74	1E
Subsect. <i>Sellowiorum</i> B.W. van Ee						
<i>Croton sellowii</i> Baill.	Mamanguape, PB	JMPCordeiro 600	20	-	2,01	1F
Sect. <i>Lasiogyne</i> (Klotzsch) Baill.						
<i>Croton tricolor</i> Klotzsch ex Baill.	Barra da Estiva, BA	LPFelix 15557	20*	-	2,63	1G
<i>Croton jacobinensis</i> Baill.	Areia, PB	ASSantos 03	20	20	2,32	1H-J
<i>Croton argyrophyllus</i> Kunth	Itaberaba, BA	LPFelix 15575	20	20	1,34	
<i>Croton argyrophyllus</i> Kunth	Brejo da Madre de Deus, PE	LPFelix 15636	20	20	1,40	2B
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.	Esperança, PB	ASSantos 30	20	20	1,62	2C
<i>Croton limae</i> A.P. Gomes, M.F. Sales P.E. Berry	Jussiapé, BA	LPFelix, 15554	ca.100*	-	1,46	2F
Unplaced						
<i>Croton pulegioides</i> Müll.Arg.	Jussiapé, BA	LPFelix 15553	22	20	2,00	2A
	Campina Grande, PB	ASSantos 19	20	20	1,95	2D
<i>Croton</i> sp1.	Abaíra, BA	LPFelix 15558	20		—	2E
<i>Croton</i> sp2.	Areia, PB	LPFelix S/N	20		1,80	2G

*Primeira contagem cromossômica para a espécie.

Tabela 2. Lista de espécies de *Croton*, organizadas de acordo com a classificação de van Ee et al. (2001), usadas na reconstrução do número básico ancestral do gênero, seus números cromossômicos diploides ($2n$ e n), respectivas referências, e código das sequências extraídas no GenBank.

TAXON	n	$2n$	Fonte	Sequências ITS-GenBank
<i>Croton</i> subg. <i>Adenophylli</i> (Griseb.) Riina, B.W. van Ee & P.E. Berry				
11. <i>Croton</i> sect. <i>Adenophylli</i> Griseb.				
<i>Croton bonplandianus</i> Baill.	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971185.1
<i>Croton bonplandianus</i> Baill. (as <i>Croton sparsiflorus</i> Morong)	8, 10	20, 40, 50	IPCN*	-
<i>Croton ciliatoglandulifer</i> Ortega	10		IPCN	AY971194.1
<i>Croton cortesianus</i> Kunth	10		CCDB*	-
<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth		40, 20	Pôrto et al. (2014), PW*	-
<i>Croton lanatus</i> var. <i>lorentzii</i> (M. Arg.) P. E. Berry (as <i>Croton lorentzii</i> M. Arg.)	10		CCDB	HM564084.1
<i>Croton ruizianus</i> M. Arg.		64, ~128	CCDB	AY971245.1
<i>Croton xalapensis</i> Kunth		c.60	CCDB	EU477988.1
<i>Croton grandivelum</i> Baill. (as <i>Croton grandivelus</i> Baill.)		38	Pôrto et al. (2014)	-
<i>Croton</i> subg. <i>Geiseleria</i> A. Gray				
13. <i>Croton</i> sect. <i>Eremocarpus</i> (Benth.) G.L. Webster				-
<i>Croton setigerus</i> Hook. (as <i>Eremocarpus setigerus</i> (Hook.) Benth.)	10	20	CCDB	AY971249.1
15. <i>Croton</i> sect. <i>Eluteria</i> G riseb.				-
15a. <i>Croton</i> subsect. <i>Eluteria</i> (Griseb.) B.W. van Ee & P.E.Berry				-
<i>Croton caudatus</i> Geiseler	10		CCDB	
18. <i>Croton</i> sect. <i>Drepadenium</i> (Raf.) Müll. Arg.				-
<i>Croton californicus</i> M. Arg. (as <i>Croton californicus</i> var. <i>tenuis</i> (S. Watson) A. M. Ferguson)	18		IPCN	AY971189.1
<i>Croton dioicus</i> Cav.	14		IPCN	AY971203.1

<i>Croton punctatus</i> Jacq.	14		CCDB	AY971240.1
<i>Croton robustus</i> Kurz	10		Soontornchainaksaeng & Chaiyasut (1999)	AB375077.1
<i>Croton wigginsii</i> L. C. Wheeler	14		CCDB	EU478024.1
20. <i>Croton</i> sect. <i>Pedicellati</i> B.W. van Ee & P.E. Berry				-
<i>Croton pedicellatus</i> Kunth		18	Pôrto et al. (2014)	FJ614766.1
21b. <i>Croton</i> subsect. <i>Argentini</i> B.W. van Ee & P.E. Berry				-
<i>Croton argentinus</i> M. Arg.	10		Di Fulvio (1973)	HM071943.1
26. <i>Croton</i> sect. <i>Geiseleria</i> (A. Gray) Baill.				-
<i>Croton adamantinus</i> Müll.Arg.		20	PW	-
<i>Croton glandulosus</i> L.		16	Pôrto et al. (2014)	AY971211.1
<i>Croton hirtus</i> L'Hér.	8	16	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	EU478070.1
<i>Croton grewioides</i> Baill.		20	PW	-
27. <i>Croton</i> sect. <i>Barhamia</i> (Klotzsch) Baill.				-
27a. <i>Croton</i> subsect. <i>Barhamia</i> (Klotzsch) B.W. van Ee				-
<i>Croton urticifolius</i> Lam.		20	Pôrto et al. (2014), PW	-
<i>Croton rudolphianus</i> Müll.Arg.		20	PW	-
27e. <i>Croton</i> subsect. <i>Sellowiorum</i> B.W. van Ee				-
<i>Croton sellowii</i> Baill		20	Lira-Neto (2011), PW	HM564095.1
29. sect. <i>Julocroton</i> (Mart.) G.L. Webster				-
<i>Croton argenteus</i> L		30	Pôrto et al. 2014	AY971181.1
<i>Croton subpannosus</i> M. Arg. ex Griseb.	10		Di Fulvio (1973)	AY971253.1
30. <i>Croton</i> sect. <i>Lasiogyne</i> (Klotzsch) Baill.				-
<i>Croton argyrophyllus</i> Kunth		20	Pôrto et al. 2014, PW	HM564076.1
<i>Croton blanchetianus</i> Baill.		20	Pôrto et al. (2014), PW	-
<i>Croton jacobinensis</i> Baill.		20	Pôrto et al. 2014, PW	HM044795.1
<i>Croton limae</i> A.P. Gomes, M.F. Sales P.E. Berry	ca.100		PW	-

<i>Croton tricolor</i> Klotzsch ex Baill.		20	PW	EF421752.1
31. <i>Croton</i> sect. <i>Heptallon</i> (Raf.) Müll. Arg.				-
<i>Croton monanthogynus</i> Michx.		16	CCDB	EU478114.1
<i>Croton palmeri</i> S.Watson		16	CCDB	-
<i>Croton pottsii</i> (Klotzsch) M. Arg.	20		IPCN	EU478119.1
Old World				-
<i>Croton aromaticus</i> L.	10		CCDB	-
<i>Croton cascarilloides</i> Raeusch.	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	KP878331.1
<i>Croton caudatus</i> Geiseler	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971192.1
<i>Croton hutchinsonianus</i> Hosseus	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971218.1
<i>Croton joufra</i> Roxb.	10	20	CCDB	-
<i>Croton kerrii</i> A. Shaw	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971221.1
<i>Croton klotzschianus</i> (Wight) Thwaites	10, 11	20	CCDB	AY971222.1
<i>Croton kongensis</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971223.1
<i>Croton persimilis</i> M. Arg. (as <i>Croton oblongifolius</i> Roxb.)	10, 11		IPCN	-
<i>Croton persimilis</i> M. Arg. (as <i>Croton roxburghii</i> N. P. Balakr.)	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	-
<i>Croton poilanei</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	AY971239.1
<i>Croton stellatopilosus</i> H. Ohba	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	KP878391.1
<i>Croton sublyratus</i> Kurz	10		Soontornchainaksaeng & Chaiyasut (1999)	-
<i>Croton thorelii</i> Gagnep.	10	20	Soontornchainaksaeng et al. (2003)	KP878398.1
<i>Croton tiglium</i> L.	10		Soontornchainaksaeng & Chaiyasut (1999)	KP878399.1

Unplaced				-
<i>Croton pulegioides</i> M. Arg.		20, 22	Pôrto et al. (2014), PW	-
<i>Croton sarcopetalus</i> M. Arg.	32		Bernardello et al. (1990)	EU586912.1
<i>Croton</i> sp1.		20	PW	-
<i>Croton</i> sp2.		20	PW	-
Out group				-
<i>Astraea lobata</i> (L.) Klotzsch		18	Pôrto et al. (2014)	AY971172.1
<i>Jatropha curcas</i> L.	11	22, 33, 44	CCDB	EU700457.1
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.		22	CCDB	EU881725.1

* PW: contagens próprias; CCDB: Chromosome Counts Database; IPCN: Index to Plant Chromosome Numbers.

RESULTADOS

Números cromossômicos e padrão de bandas CMA/DAPI

Todas as espécies estudadas apresentaram $2n = 20$, exceto uma população de *Croton pulegioides* Müll.Arg. com $2n = 22$ (Fig. 2A) e *Croton limae* A.P.Gomes, M.F.Sales P.E Berry, com $2n = \text{ca.}100$ (Fig. 2G), cariótipos simétricos exibindo cromossomos principalmente metacêntricos e, mais raramente submetacêntricos, diminuindo gradativamente de tamanho, com médias desde $1,22\mu\text{m}$ em *C. grewioides* Baill., até $3,50\mu\text{m}$ em *C. rudolphianus* Müll.Arg. (Tabela 1). Apresentaram pelo menos duas bandas heterocromáticas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ maiores, geralmente distendidas, localizadas na região terminal do braço curto de um par cromossômico correspondente a RON. Todavia, para *C. sellowii* Baill, esta região heterocromática foi inconspícua (Fig. 2G), enquanto para todas as espécies da Sect. *Barhamia* (Klotzsch) Baill., *C. rudolphianus* Müll.Arg. (Fig. 1D), *C. urticifolius* Lam. (Fig. 1E) e *C. sellowii* Baill (Fig. 1F), a RON foi proximal. Nesses casos, em prometáfase, a porção distal do braço curto aparecia como um grande satélite destacado.

Regiões proximais mais fortemente coradas com CMA do que com DAPI foram observadas em todas as espécies, sem, entretanto, formar bandas claramente visualizadas. Contudo, nos cromossomos prometafásicos de algumas espécies, essas regiões foram mais claramente observadas (ver Figs. 1C, G, H-J e 2 A, C-F), sugerindo tratar-se de regiões heterocromáticas ricas em GC. Um padrão diferenciado para bandas CMA^+ foi observado em *Croton pulegioides* da população de Jussiape que apresentou um par de cromossomos com duas bandas CMA terminais (Fig. 2A, setas). Curiosamente, todas as espécies apresentaram regiões distais de todos os braços cromossômicos (exceto as RONs), mais fortemente corados como DAPI do que com CMA. Assim como nas regiões proximais CMA^+ , os terminais cromossômicos mais fortemente corados com DAPI foram melhor visualizados em prometáfase, formando grandes blocos DAPI^+ . Bandas DAPI^+ puntiformes foram observadas nas regiões intersticiais e proximais de *C. urticifolius*. Esta espécie também se diferenciou por apresentar terminais de pelo menos um par cromossômico com pequenas bandas CMA^+ .

Número básico ancestral e evolução cariotípica do gênero *Croton*

A lista de espécies compiladas para a tabela 2, organizada em secções de acordo com a classificação proposta por van Ee et al. (2011) é formada por 49 espécies distribuídas entre 10

secções, além das espécies do Velho Mundo, e cinco espécies listadas como *unplaced*, por ainda não estarem incluídas em nenhuma das secções adotadas aqui. Todas as espécies listadas possuem contagens cromossômicas para tecidos somáticos indicados como $2n$ e/ou para números haploides indicados como n .

As análises de filogenia molecular das regiões ribossomais ITS combinadas com registros de contagens cromossômicas, permitiram uma melhor compreensão da evolução cariotípica do gênero *Croton*. O número básico $x = 10$ aparece como o mais provável ancestral do gênero (*Proportional Likelihoods* = 0.99795488), assim como para os subgêneros *Adenophylli* (Griseb.) Riina, B.W. van Ee & P.E. Berry e *Geiseleria* A. Gray, com *Proportional Likelihoods* > 0.99 para $x = 10$), como pode ser observado na Figura 3. A Seção *Adenophylli* Griseb., (subg. *Adenophylli*) e as espécies de *Croton* do Velho Mundo (subg. *Croton*), localizados nas análises de filogenia molecular entre os clados mais basais do gênero, apresentam predominância de $x = 10$ para suas espécies, o que justifica a confirmação probabilística deste número como o mais plesiomórfico para *Croton*. Embora algumas espécies da seção *Adenophylli* apresentem números básicos diferentes de $x = 10$, como *Croton xalapensis* Kunth ($x = 32$), *C. ruizianus* M. Arg. ($x = 8$) e *C. sarcopetalus* Mull. Arg., ($x = c.60$), estes números não obtiveram valores significativos de *Proportional Likelihoods* para o número básico ancestral do gênero.

Em clados mais derivados no subg. *Geiseleria*, como as seções *Barhamia*, *Julocroton* (Mart.) G.L. Webster e *Lasiogyne* (Klotzsch) Baill., também ocorre o predomínio de $x = 10$. Coincidentemente, o número básico $x = 8$ presente em espécies de clados basais, também ocorre em espécies de clados derivados, conforme se observa em *Croton hirtus* L'Hér e *C. gladulosus* L., (seção *Geiseleria* (A. Gray) Baill.), e *C. monanthogynus* Michx., (seção *Heptallon* (Raf.) Müll. Arg.). Todavia, o baixo número de espécies com registros de $x = 8$ sugere que este valor pode estar mais relacionado a ocorrência de disploidia a partir de um ancestral com $x = 10$, do que a um caráter primitivo para o gênero *Croton*.

Verifica-se com a reconstrução de caracteres ancestrais que a variação cromossômica numérica observada em *Croton* concentra-se especialmente em determinadas seções do gênero. Por exemplo, os registros de $x = 14$ e $x = 18$ ocorrem apenas em representantes da seção *Drepadenium* (Raf.) Müll. Arg. (subg. *Geiseleria*), enquanto $x = 32$ e $x = c.60$, apenas na seção *Adenophylli*. Da mesma forma, *Croton pedicellatus* Kunth (seção *Pedicellati* B.W. van Ee & P.E. Berry, subg. *Geiseleria*) apresentou número cromossômico básico diferente das demais espécies do gênero ($x = 9$). Este mesmo valor é reportado para *Astraea lobata*, espécie

associada ao gênero *Croton*. Contudo, essa similaridade numérica parece mais relacionada à disploidia decrescente e assim, representa uma homoplasia.

Os valores probabilísticos apontados pela reconstrução de caracteres ancestrais permite afirmar de forma geral que a evolução cariotípica no gênero *Croton* se originou com um ancestral de número básico $x = 10$ e manteve este número até as linhagens mais derivadas, porém com episódios de variações decorrentes de rearranjos cromossômicos, seja por aneuploidias ($x = 8, 9$) ou disploidia ascendente ($x = 14, 18, 32, c.60$) em determinadas seções do gênero.

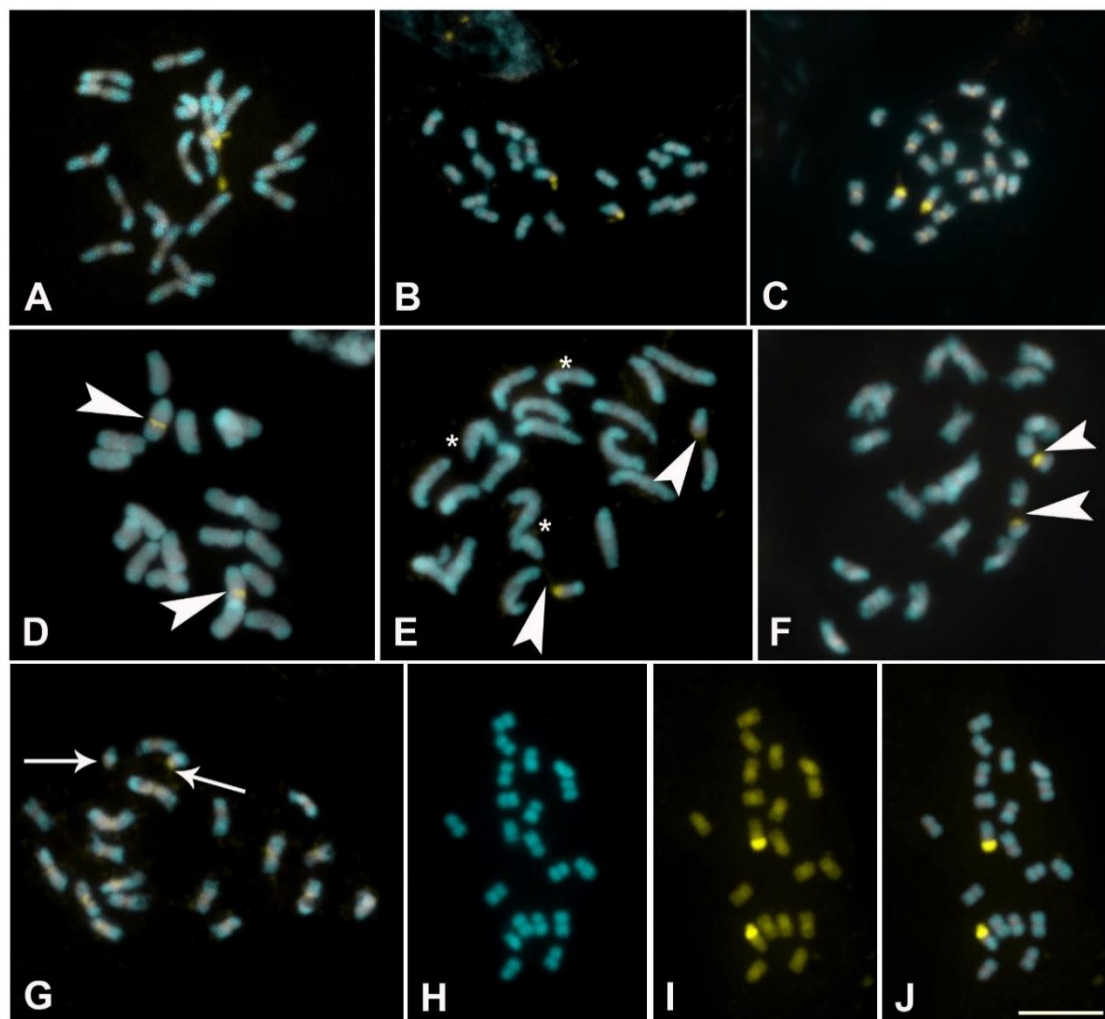


Figura 1. Dupla coloração CMA (amarelo) e DAPI (azul) em espécies de *Croton* seções *Adenophylli* (A), *Geiseleria* (B-C), *Barhamia* (D-E), *Sellowiorum* (F) e *Lasiogyne* (G-J). Todas com $2n = 20$. A. *Croton heliotropiifolius*; B. *Croton adamantinus*; C. *Croton grewioides*; D. *Croton rudolphianus*; E. *Croton urticifolius*; F. *Croton sellowii*; G. *Croton tricolor*; H-J. *Croton jacobinensis* corado com DAPI (H), CMA (I) e CMA/DAPI sobrepostos (J). Setas em G indicam satélites; cabeças de seta em D, E, F, indicam RON proximal; estrelas em E, bandas DAPI puntiformes; barra em J equivale a 10μ .

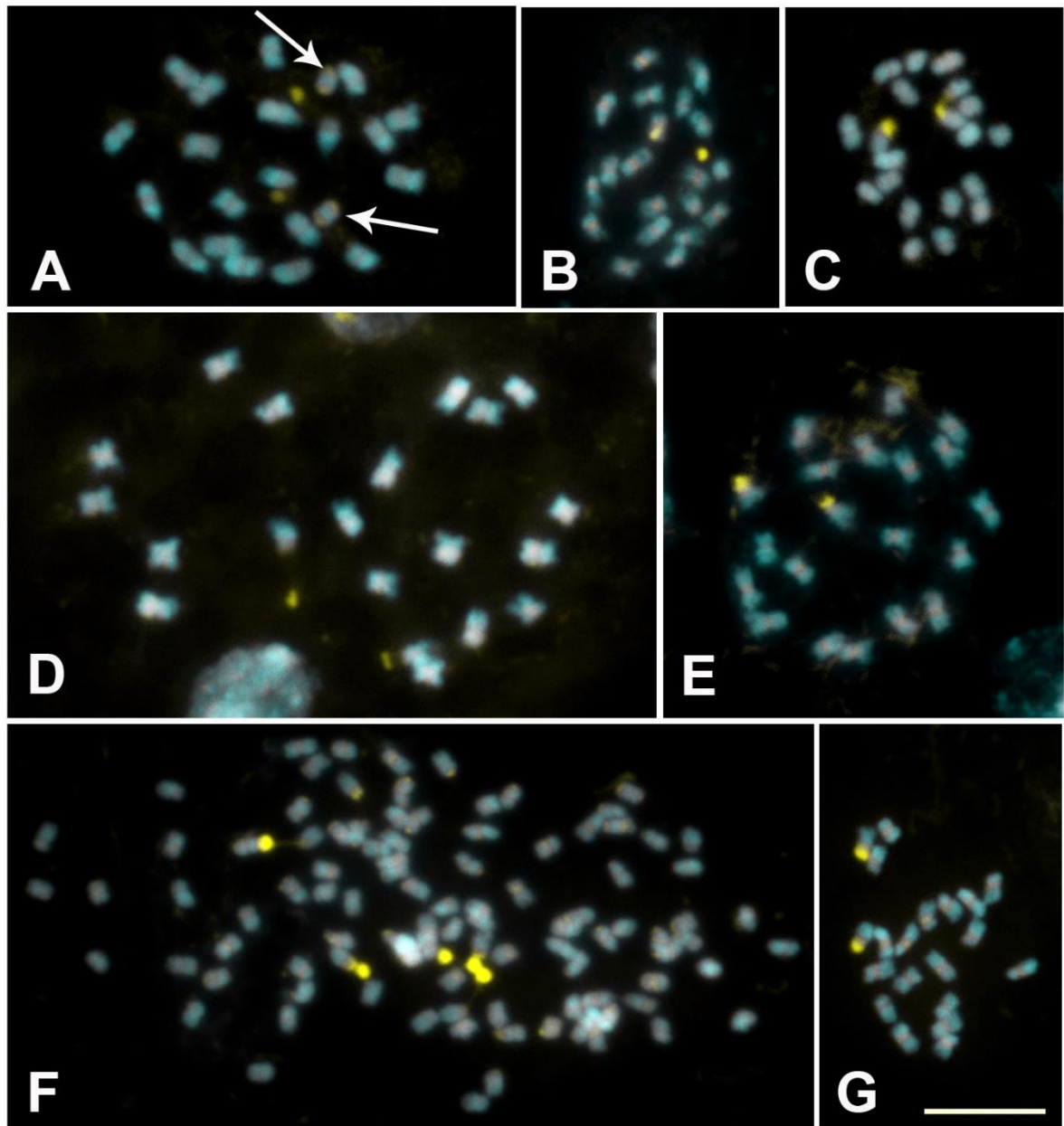


Figura 2. Dupla coloração CMA (amarelo) e DAPI (azul) em espécies de *Croton* sect. *Lasiogyne* (B-C) e unplaced (A, D-E). A. *Croton pulegioides* ($2n = 22$, população Jussiape); B. *Croton argyrophyllus* ($2n = 20$); C. *Croton blanchetianus* ($2n = 20$); D. *Croton pulegioides* ($2n = 20$, população Campina Grande); E. *Croton* sp1. ($2n = 20$); F. *Croton limae* $2n = \text{ca.}100$); G. *Croton* sp2. ($2n = 20$). Setas em A indicam bandas CMA terminais; barra em G equivale a 10μ .

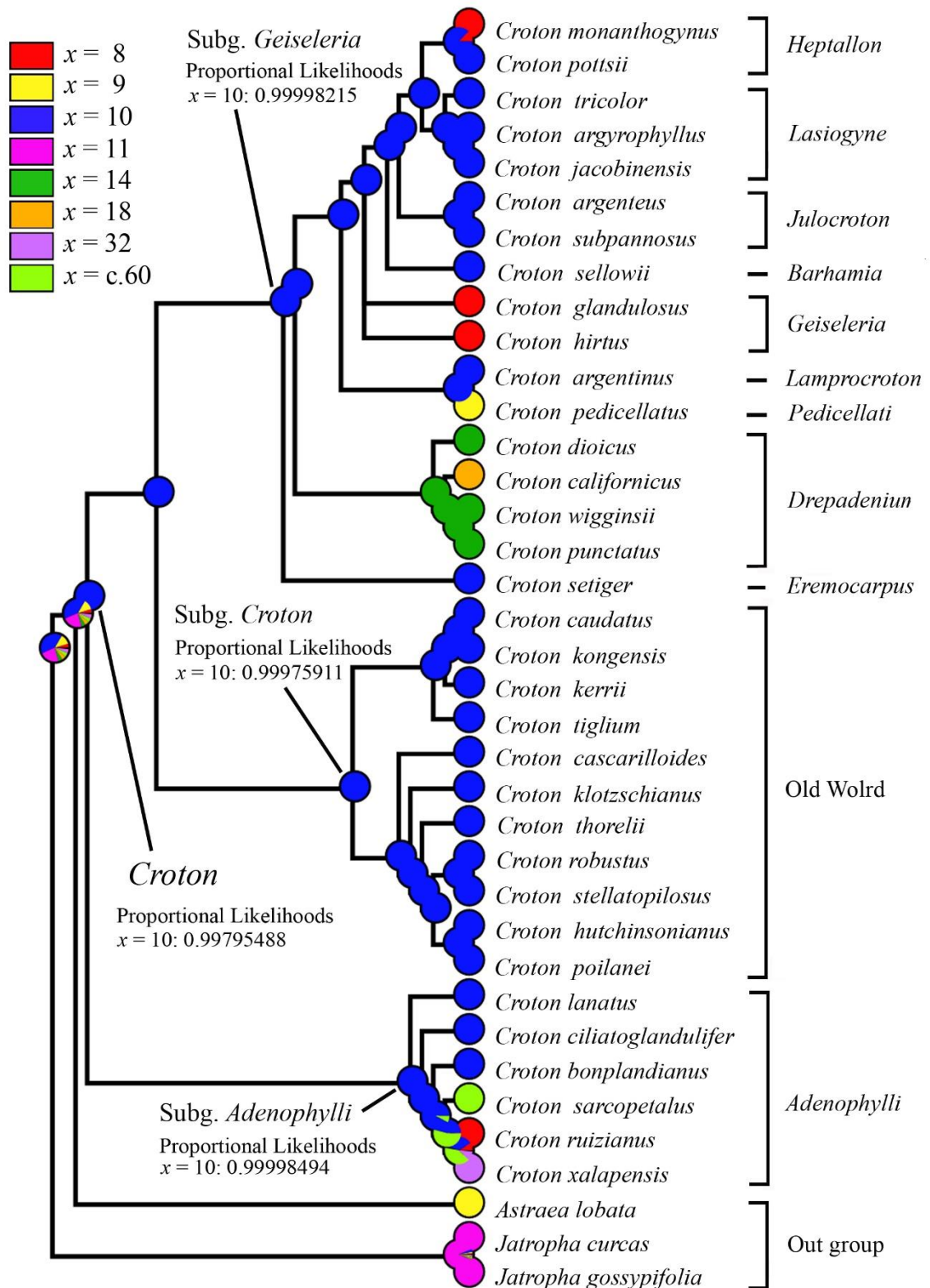


Figura 3. Evolução cariotípica do gênero *Croton*, baseada nas regiões ITS incorporadas com informações de contagens cromossômicas. Os nomes e posicionamentos dos clados foram organizados de acordo com van Ee et al. (2011).

DISCUSSÃO

Das 15 espécies analisadas, cinco não possuíam registros prévios de contagens cromossômicas, *Croton limae* com $2n = \text{ca.}100$, *Croton rudolphianus*, *C. tricolor* Klotzsch ex Baill., *C. adamantinus* Müll. Arg., e *Croton grewioides* Baill., com $2n = 20$. As demais tiveram suas contagens prévias confirmadas, exceto a contagem de $2n = 40$ para *Croton heliotropiifolius* Kunth., da secção *Adenophylli* realizada por Pôrto et al. (2014) para outro indivíduo de uma das duas populações analisadas para esta espécie em nosso trabalho (Chã de Jardim, Areia, Paraíba), ambas com $2n = 20$. Duas outras espécies desta mesma secção, *C. bonplandianus* Baill. e *C. ruizianus* (Tab. 2), também apresentaram poliploidia intraespecífica. A secção *Adenophylli*, a maior e mais amplamente dispersa secção de *Croton*, composta por 223 espécies (*sensu* van Ee et al. 2011), possui registro cromossômico para apenas oito espécie (menos de 3,5% do total das espécies da secção). Contudo, o registro de poliploidia intraespecífica para três das oito espécies analisadas, juntamente com a contagem de $2n = 38$ para *Croton grandivelum* Baill. (Porto et al. 2014), destaca a importância das variações cromossômicas numéricas (disploidia e poliploidia) na evolução desta seção. Além da seção *Adenophylli*, o único registro de poliploidia em *Croton* foi o restrito para *C. limae* ($2n = \text{ca.}100$), secção *Lasiogyne*. Para *Croton pulegioides*, não incluído em nenhuma das das secções proposta por van Ee et al. (2011), a contagem prévia de $2n = 20$ foi confirmada apenas para uma das populações analisadas (Campina Grande), enquanto para a população de Jussipe foram observados cariótipos com $2n = 22$.

O gênero *Croton*, apesar ser reconhecido com um dos maiores gêneros de Angiospermas, é considerado monofilético, sendo dividido em quatro subgêneros (subg. *Geisleria*, subg. *Croton*, subg. *Adenophylli* e subg. *Quadrilobi* (Müll. Arg.) Pax in Engl. & Prantl) e 31 secções, a maioria monofiléticas (Webster, 1993; Berry et al. 2005; van Ee e Berry, 2010; van Ee et al. 2011). A reconstrução de caractere ancestral confirmou esta monofilia, com um número básico ancestral $x = 10$ (Proportional Likelihoods > 0.99) para os subgêneros *Geisleria*, *Croton* e *Adenophylli*. O subgênero *Quadrilobi*, considerado grupo irmão dos demais subgêneros de *Croton* (van Ee et al. 2011), não teve representantes analisados cariológicamente. A carência de contagens cromossômicas para este subgênero pode ser decorrente de sua baixa diversidade, raridade e restrição na distribuição geográfica de suas espécies (van Ee et al. 2011). Embora não haja contagens cromossômicas para o subg. *Quadrilobi*, os elevados valores de Proportional Likelihoods para $x = 10$ como número básico

do gênero *Croton* não seriam consideravelmente alterados, mesmo que o registro cromossômico para as espécies deste subgênero fossem diferentes de $x = 10$.

As espécies de *Croton* do velho mundo (subg. *Croton*) apresentam notável estabilidade cariotípica, com ocorrência de $x = 10$ em todas as espécies analisadas (Soontornchainaksaeng, 1999; Soontornghainaksaeng et al. 2003). Da mesma forma, diversas seções do subgênero *Geiseleria*, como *Lasiogyne*, *Julocroton* e *Barhamia*, também apresentam para todas as espécies com número cromossômicos conhecidos, $x = 10$ (Tab. 2). Em contrapartida, algumas seções como *Heptallon* e *Geiseleria* com $x = 8$, e *Pedicellati* com $x = 9$, diferem do número básico ancestral do gênero como um todo, por apresentar disploidias descendentes.

Uma das maiores variedades numéricas entre as seções de *Croton* se concentra na seção *Drepadenium* com registros de $n = 10, 14, 18$. Espécies desta seção são encontradas em áreas desérticas, pradarias, dunas, áreas rochosas, áreas abertas e vegetação perturbada, especialmente nos Estados Unidos e México, e apresentam como sinapomorfia morfológica a ausência de pétalas nas flores estaminadas (van Ee et al. 2011). Há contagens cromossômicas para cinco das seis espécies desta seção, e apenas uma espécie, *Croton robustus* Kurz, apresentou $x = 10$, sugerindo uma maior adaptabilidade dos citotipos disploides a esses ambientes.

Outro clado que apresenta variação quanto ao número cromossômico corresponde à seção *Adenophylli* (subg. *Adenophylli*), com registro dos maiores números básicos para *Croton*: $x = 32$ (*C. xalapensis*) e c.60 (*C. sarcopetalus*), além do menor número básico, $x = 8$, para *Croton ruizianus* e de $x = 10$ para várias espécies da seção. Esta variação cromossômica pode ter sido vantajosa para a adaptação e diversificação das espécies da seção *Adenophylli* com 223 espécies ocupando diversos habitats, especialmente áreas semiáridas e vegetação secundária entre os Estado Unidos, México, América Central, e por todos os países da América do Sul (van Ee et al. 2011).

Em nossa amostra, o registro de disploidia intraespecífica para *C. pulegioides* até o momento constitui o único registro para o gênero. Em *Croton* as maiores variações disploides têm sido observadas na seção *Drepadenium* que é até o momento a seção mais bem estudada em termos cromossômicos. O registro de variação numérica intraespecífica observada em relação a *C. pulegioides* (disploidia) e *C. heliotropiifolius* (poliploidia) sugere um papel importante na diversificação cariotípica do gênero *Croton* como um todo.

Cariótipos formados por heterocromatina rica em GC associada às RONS e às regiões pericentroméricas, além da heterocromatina rica em AT nos terminais cromossômicos,

formaram o padrão de bandas CMA/DAPI mais comum entre as espécies analisadas de *Croton*. A localização proximal da heterocromatina associada a RON caracterizou as três espécies da secção *Barhamia*. Esta secção com 84 espécies tem como sinapomorfias o DNA nuclear e plastidial (ITS, *EMB2765* exon 9, *trnL-F*, and *rps3*), além de brácteas da inflorescência glandulares (van Ee et al. 2011) e, a ocorrência de RON proximal poderá constituir mais uma sinapomorfia para o grupo. Por outro lado, a presença de heterocromatina pericentromérica CMA⁺ em todas as espécies analisadas de *Croton* parece ter uma distribuição mais ampla na família, tendo sido observada em algumas espécies de *Manihot* Mill., (Carvalho & Guerra, 2002) e em *Ricinus communis* L. (Vasconcelos et al. 2010). Heterocromatina pericentromérica é observada praticamente em todos os organismos eucariotos (Alper et al. 2012), embora nem sempre seja visualizada como bandas diferencialmente coradas. Em nossa amostra, a heterocromatina pericentromérica foi mais facilmente visualizada em algumas espécies como *C. grewoides*, e *Croton* sp₁, enquanto em outras, como em todas as espécies da secção *Barhamia*, essas regiões foram apenas ligeiramente mais coradas com CMA e apenas visualizadas em prometáfase. Centrômeros em plantas são estruturas altamente complexas envolvendo centenas de kilobases de DNA satélite, que evoluem muito rapidamente em função da baixa pressão de seleção atuante nessa região do genoma (revisado por Malik, 2009).

A ocorrência de um par cromossômico menor com heterocromatina terminal CMA⁺ em *Croton* pulegioides, pode estar relacionada a um evento de fissão cêntrica seguida de amplificação da heterocromatina rica em GC. Fusões Robertsonianas e fissões são mais frequentes em animais, tendo sido documentada em poucas espécies dos gêneros *Tradescantia* L., *Licoris* Herb. e *Paphiopedilum* Pfitzer (revisado por Jones, 1998). Contudo, a direção dessa alteração numérica é dificultada quando não se tem o conhecimento do número básico ancestral. Para o gênero *Croton*, entretanto, o número básico $x = 10$ foi fortemente suportado em nossa análise, o que favorece a hipótese da fissão cêntrica para o aumento de número cromossômico na população de *C. pulegioides* da Bahia.

A variabilidade em número e tamanho dos blocos de heterocromatina proximal observada em nossa amostra não é filogeneticamente informativa. Contudo, na subsecção *Barhamia*, *C. rudolphianus* e a espécie relacionada *C. urticifolius*, diferiram pela presença de uma pequena banda pericentromérica DAPI⁺ em *C. rudolphianus*. Blocos mais fortemente corados com DAPI do que com CMA observados nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos de todas as espécies parece ser um padrão incomum de distribuição para esse tipo de heterocromatina, só observado em alguns grupos de plantas não relacionados como em

algumas espécies de orquídeas dos gêneros *Phalaenopsis* Blume., (Kao et al. 2001) e *Acianthera* Scheidw (Oliveira et al. 2015) e em *Ricinus communis* (Vasconcelos et al. 2011). Contudo, apenas em *Croton* esse padrão é amplamente distribuído.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pelo apoio financeiro. Ao pessoal dos Laboratórios de Citogenética Vegetal e de Ecologia e Reprodução Vegetal da Universidade Federal da Paraíba, Brasil, pelo suporte técnico, as professoras Maria de Fátima Araújo Lucena, da Universidade Federal de Campina Grande, e Daniela Santos Carneiro-Torres da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pela identificação das espécies, e ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA) pelo apoio nas coletas de campo.

REFERÊNCIAS

- Almeida CCS, Carvalho PCL, Guerra M. (2007) Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umbu-cajá (Anacardiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 155: 541–547.
- Alper BJ, Lowe BR, Partridge JF. (2012) Centromeric heterochromatin assembly in fission yeast—balancing transcription, RNA interference and chromatin modification. *Chromosome Research* 20:521–534.
- Barros e Silva AE, Guerra M. (2009) The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH produces. *Biotechnic & Histochemistry*. 99999:1.
- Bernardello LM, Stiefkens LB, Piovano MA. (1990) Números cromosômicos en dicotiledóneas Argentinas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 26: 149–157.
- Berry PE, Hipp AL, Wurdack KJ, Van Ee B, Riina R. (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae) using ITS and TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany* 92(9): 1520–1534.
- Brasileiro-Vida AC, Santos-Cerejo JA, Soares-Filho WS, Guerra M. (2007) A simple chromosomal marker can reliably distinguishes *Poncirus* from *Citrus* species. *Genetica* 129: 273–279.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M. (2006) Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology* 29: 659–664.
- Carneiro-Torres DS, Cordeiro I, Giulietti AM, Berry PE, Riina R. (2011) Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia* 63(1): 122–132.
- Carvalho R, Guerra M. (2002) Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136: 159–168.
- Carvalho R, Soares-Filho WS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M. (2005) The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenetic and Genome Research* 109: 276–282.

Cordeiro I, Secco R, Carneiro-Torres DS, Lima LR de, Caruzo MBR, Berry P, Riina R, Silva OLM, Silva MJda, Sodré RC. (2015) *Croton* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 27 Jan. 2016.

Cusimano N, Sousa A, Renner SS. (2012) Maximum likelihood inference implies a high, not a low, ancestral haploid chromosome number in Araceae, with a critique of the bias introduced by ‘x’. *Annals of Botany* 109: 681–692.

Di Fulvio TE. (1973) Recuentos cromosomicos en Angiospermas Argentinas. II. *Kurtziana* 7: 39–42.

Govaerts R, Fernández-Casas FJ, Barker C, Carter S, Davies S, Esser HJ, Gilbert M, Hoffmann P, Radcliffe-Smith A, Steinmann V, van Welzen P, Whitmore T. (2016) World Checklist of Euphorbiaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/> Retrieved 2016-01-20.

Guerra M. (1993) Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMADAPI staining. *Heredity* 71 234-241.

Guerra M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 23: 1029-1041.

Guerra M. (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Research* 120:339–350.

Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Jones K. (1998) Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *The Botanical Review* 64: 273-289.

Kao YY, Chang SB, Lin TY, Hsieh CH, Chenk YH, Chenk WH, Chen CC. (2001) Differential Accumulation of Heterochromatin as a Cause for Karyotype Variation in *Phalaenopsis* Orchids. *Annals of Botany* 87: 387–395.

Lira-Neto AC. (2011) Caracterização genética de espécies de *Croton* (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste brasileiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Biotecnologia – Recife.

Lucena MFA, Sales MF. (2006) Tricomas foliares em espécies de *Croton* L. (Crotonoideae – Euphorbiaceae). *Rodriguésia* 57(1): 11-25.

Maddison WP, Maddison DR. (2011) Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 3.03. Available at: <http://mesquitemproject.org> (accessed 04 April 2015).

Malik HS. (2009) The Centromere-Drive Hypothesis: A Simple Basis for Centromere Complexity. In: Đ. Ugarković (ed.), *Centromere*, Progress in Molecular and Subcellular Biology Springer-Verlag Berlin Heidelberg 33–52.

Mendonça de Almeida E, Wanderley AM, Assis FNM, Costa FR, Luiz Gustavo R. Souza LGR, Felix LP. *in press* A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. *Systematic Botany*.

Miller KI, Webster GL. (1966) Chromosome numbers in the Euphorbiaceae. *Brittonia* 18: 372-379. Oct-Dec.

Moraes AP, Leitch IJ, Leitch AR. (2012) Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 29–39.

Oliveira IG, Moraes AP, Almeida EM, Assis FNM, Cabral JS, Barros F, Felix LP. (2015) Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *Botanical Journal of the Linnean Society* 178: 102–120.

Pessoa E, Felix LP, Alves M. (2014) A new *Epidendrum* (Laeliinae-Orchidaceae) from the Atlantic Forest of northeastern Brazil: Evidence from morphology and cytogenetics. *Brittonia* 66: 347–352.

Pôrto NA, Martins MTCS, Alves LIF, Costa FR, Neves JAL, Bruno RLA, Lucena MFA, Felix LP. (2014) Euphorbiaceae. IAPT/IOPB chromosome data 18. Marhold (ed.) *TAXON* 63 (6), December: 1–33.

- Rego LNAA, da Silva CRM, Torezan JMD, Gaeta ML, Vanzela ALL. (2009) Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lycianthes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 279: 93–102.
- Rice A, Glick L, Abadi S, Einhorn M, Kopelman NM, Salman-Minkov A, Mayzel J, Chay O, Mayrose I. (2015) The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome number. *New Phytologist* 206: 19–26.
- Saitou N. Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406–425.
- Secco RS. (2008) Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) na Amazônia brasileira: um ensaio taxonômico. Coleção Adolpho Ducke. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém. 169p.
- Soontornchainaksaeng P. Chaiyasut K. (1999) Cytogenetic investigation of some Euphorbiaceae in Thailand. *Cytologia* 64: 229–234.
- Soontornchainaksaeng P, Chantaranothai P, Senakun C. (2003) Genetic Diversity of *Croton* L. (Euphorbiaceae) in Thailand. *Cytologia* 68(4): 379–382.
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. (2012) Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* 109: 987–999.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030–11035.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M. (2013) Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections *Corniculatae* and

Ripariae (Oxalidaceae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.019>.

Van Ee BW, Berry PE. (2010) Taxonomy and Phylogeny of *Croton* Section *Heptallon* (Euphorbiaceae). *Systematic Botany* 35(1):151-167.

Van Ee BW, Riina R, Berry PE. (2011) A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 60 (3): 791–823.

Vasconcelos S, Souza AA, Gusmão CLS, Milani M, Benko-Iseppon AM, Brasileiro-Vidal AC. (2010) Heterochromatin and rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron* 41: 746–753.

Webster GL. (1993) A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42: 793–823.

Genetics and Molecular Biology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

Genetics and Molecular Biology follows an Open-Access policy. Articles are made available in full content at SciELO. Back issues dating to 1998 are available through this site.

Back issues of the earlier titles (Brazilian Journal of Genetics and Revista Brasileira de Genética) are hosted at the journal's own site: <http://www.gmb.org.br>

Articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central, and there available as a full text version.

The official abbreviation for Genetics and Molecular Biology is **Genet. Mol. Biol.**

Submission of papers

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through a Scholar One submission platform hosted at: <http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>

The cover letter should be addressed to:
Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

a) The manuscript must be submitted by the Corresponding Author. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment that may incur during the editorial process.

b) Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file. Furthermore, a cover letter addressed to the Editor is required. It must be edited by the corresponding author inserted within the reserved data field

c) Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed.

d) The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.

e) In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and not-preferred reviewer(s).

f) Files must be uploaded separately and identified according to file types. The main text file must include references and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.h).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by

the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Binomial Names: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested byNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. PLoS One 4:e7713.

f) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM),
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM

Software,

http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2005)

g) **Tables** must be in Word format prepared with table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

h) **Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted.

Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure.

Figure legends must be included in the main text file and should be typed on a new page that immediately follows the tables.

i) **Nomenclature** should adhere to current international standards.

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will delay publication.

k) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used

for reported studies.

l) **Ethical issues:** reports of experiments on live vertebrates must include a statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: Supplementary material - the following online material is available for this article:

- Table S1 < short title >
- Figure S1 - < short title >

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor should be contacted prior to submission.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to a copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the

highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de barreiras reprodutivas como sincronia de floração, compartilhamento de polinizadores, e biologia floral entre espécies simpátricas do gênero *Croton*, apontam fracas ou ausentes barreiras pré-zigóticas, já que foi observada a sobreposição e sincronia de floração entre as espécies em cada população, a sobreposição de flores pistiladas e estaminadas em um mesmo indivíduo e o compartilhamento de agentes polinizadores entre as espécies. Ainda foi possível observar a intercompatibilidade entre as espécies, com formação de frutos interespecíficos, o que sugere a ocorrência de uma barreira de isolamento reprodutivo pós-zigótica incompleta, possibilitando a formação de híbridos interespecíficos. Diferenças cariotípicas na estrutura cromossômica parecem confirmar o isolamento reprodutivo entre essas espécies. Esses resultados associados com o estudo da germinação das sementes ainda em andamento, sugerem a necessidade de uma melhor investigação nas barreiras de isolamento reprodutivo pós-zigótico para espécies simpátricas de *Croton*.

As informações relativas ao número cromossômico de *Croton* quando analisadas conjuntamente com a filogenia molecular, suportam fortemente a hipótese de $x = 10$ como número básico primário do gênero. Números básicos secundários observados nas seções *Adenophylli* e *Drepadenium*, foram originados a partir de eventos de poliploidia e disploidia que parecem ter desempenhado um papel importante na diversificação cromossômica e taxonômica do gênero. Contudo, a extensão exata desses eventos só poderá ser avaliada ampliando-se o número de espécies analisadas, especialmente em grandes seções como *Adenophylli* e *Drepadenium*.

Terminais cromossômicos mais fortemente corados com DAPI do que com CMA, embora com intensidade variáveis, foram característicos de todas as espécies de *Croton* aqui analisadas. Por outro lado, heterocromatina proximal rica em GC, assim como bandas CMA terminais correspondentes às RONS, amplamente distribuída entre as espécies de *Croton*, estão presentes em outros grupos de plantas, são reconhecidas homoplasias. Em relação às RONS CMA⁺, restritas a espécies de duas subseções da seção *Barhamia* parecem constituir sinapomorfias para esta seção.

