

PROJETO DE TESE

PALINOLOGIA E TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE *PRAXELIS* (SUBTRIBO PRAXELINAE, EUPATORIEAE-ASTERACEAE) OCORRENTES NO BRASIL

Candidata: Vanessa Holanda Righetti de Abreu

Orientador: Dra. Vania Gonçalves Lourenço Esteves

Co-orientador: Dr. Roberto Lourenço Esteves

julho/ 2011

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Metodologia	4
4. Cronograma	7
5. Referências Bibliográficas	7

1. INTRODUÇÃO

Asteraceae é a segunda maior família de angiospermas com ca. 25.000 espécies distribuídas por todo mundo, exceto o continente Antártico (Hind 1993). Apesar dos avanços nas últimas décadas nos campos da morfologia (pelos estudos de microcaracteres florais) e no campo da biologia molecular, os pesquisadores ainda não chegaram a um consenso sobre a divisão subfamiliar. Assim, Funk *et al.* (2009) aceitaram 1.700 gêneros subordinados a 12 subfamílias e 43 tribos; Panero & Funk (2002), com base em estudos moleculares, dividiram as Asteraceae em 11 subfamílias e 35 tribos. Entretanto, o critério de classificação mais adotado pelos estudiosos da família ainda é o proposto por Bremer (1994) que dividiu as Asteraceae em três subfamílias e 17 tribos, 11 delas já estabelecidas por Cassini entre 1817 e 1830 em diferentes obras, mas cuja leitura é agora facilitada graças a King & Dawson (1975) que reuniram num volume toda a contribuição do sinantrólogo francês.

Uma possível razão para o sucesso evolutivo de Asteraceae deve-se à ocorrência de metabólitos secundários muito ativos, associados à presença de mecanismos de dispersão muito eficientes (Devore & Stuessy 1995). Estima-se que cerca de 50% dos táxons desta família ocorram no Novo Mundo, predominantemente na América Latina, sendo estimada ca. 3.000 espécies para a flora brasileira, distribuídas, principalmente, nas regiões onde dominam os tipos de vegetação árida, semi-árida e montanhosa estando ausente, ou muito pobremente representada, na floresta tropical úmida (Hind 1993).

O monofiletismo de Asteraceae é sustentado por numerosas sinapomorfias morfológicas e moleculares (Judd *et al.* 2009), como a presença de compostos secundários (iridoides e ácido elágico) e liberação do grão de pólen pelo mecanismo de êmbolo. Assim, a família se caracteriza por apresentar limites bem estabelecidos e uma uniformidade básica na estrutura floral compartilhada pela quase totalidade de seus membros, os quais dividem características comuns, tais como: agregação das flores em capítulos indeterminados com desenvolvimento centrípeto, conação das anteras, com deiscência introrsa, exposição secundária dos grãos de pólen, estilete colunar com função de êmbolo e uniformidade geral da cipsela (Bentham & Hooker 1873; Wagenitz 1976; Cronquist 1977, 1988; Judd *et al.* 2002).

Para Anderberg *et al.* (2007), a família se divide nos grandes clados “Barnadesioideae” e “não Barnadesioideae”. As não Barnadesioideae foram

divididas nas subfamílias Mutisioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae. No entanto, sabe-se que Cichorioideae é parafilética, mas seu status de subfamília é mantido pela falta de compreensão acerca das relações filogenéticas entre seus integrantes (Judd *et al.* 2009).

Entre as modificações no que toca à circunscrição genérica nas Asteraceae, as mais significativas e, em grande parte, ainda discutidas por alguns estudiosos estão aquelas modificações, para a tribo Eupatorieae, realizadas por Robert M. King & Harold Robinson em mais de uma centena de trabalhos e que foram resumidas numa publicação ricamente ilustrada (King & Robinson 1987). Neste trabalho os dois autores registraram para Eupatorieae 180 gêneros, sendo 82 para o Brasil, distribuídos em 18 subtribos. Praxelinae R.M. King & H. Rob., com sete gêneros (*Chromolaena* DC., *Eitenia* R.M. King & H. Rob., *Eupatoriopsis* Hieron., *Lomatozona* Baker, *Osmiopsis* R.M. King & H. Rob., *Praxeliopsis* G. Barroso e *Praxelis* Cass.). Nestes sete gêneros estão distribuídos ca. de 190 táxons. Os gêneros *Chromolaena* (ca. 165 spp.) e *Praxelis* (ca. 14 spp.) apresentam maior número de espécies seguidos de *Lomatozona* (4 spp), *Eitenia* (2 spp.), *Eupatoriopsis* (1 sp.), *Praxeliopsis* (1 sp.), *Osmiopsis* (1sp., sem representantes no Brasil). Esta organização taxonômica será a utilizada neste projeto.

Praxelis, gênero predominantemente sul-americano, é o segundo maior em número de espécies de Praxelinae, foi estabelecido por Cassini (1826, *apud* King & Dawson 1975) com base em *P. villosa* Cass. [= *P. diffusa* (Rich.) Pruski]. *Praxelis* foi tratado historicamente como uma das seções de *Eupatorium*. Coube a King & Robinson (1970, 1987) restabelecer o status genérico de *Praxelis*, circunscrito pelos dois autores com base nos atributos: espécies herbáceas, raramente subarborescentes, receptáculo nu e notavelmente cônico, quase cilíndrico, involúcro cilíndrico, com brácteas conspicuamente decíduas, corola em muitas espécies com lóbulo mais externo pronunciadamente mais desenvolvido, fruto cilíndrico, com carpópodio notavelmente assimétrico situando a aréola de inserção numa posição lateral ou quase lateral ao eixo de maior comprimento do fruto (Esteves 2001).

A importância da palinologia como subsídio à sistemática de grandes grupos vegetais fica evidente nas contribuições do APG II e III (2003, 2009). Na família Asteraceae, o emprego dos atributos polínicos é tradicionalmente reconhecido por sua capacidade informativa à taxonomia em diferentes níveis hierárquicos e, mais recentemente, ao posicionamento filogenético de gêneros, subfamílias e tribos. A

inclusão dos aspectos polínicos nas análises filogenéticas permite entender o surgimento e a evolução deste carácter na história evolutiva dos grupos analisados. Será possível responder, por exemplo, se os grãos de pólen porados representam uma condição apomórfica ou plesiomórfica em relação aos grãos de pólen colporados, fornecendo maiores evidências acerca da evolução polínica na tribo Eupatorieae.

O levantamento palinológico mostrou que vários autores analisaram os grãos de pólen de espécies de Asteraceae, Erdtman (1952) destacou a variabilidade na abertura, no tamanho, na forma e na ornamentação da exina; Stix (1960) criou 42 tipos polínicos para a família com base na estrutura da exina quando observada em microscopia de luz e eletrônica de transmissão; Skvarla & Turner (1966), reconheceram quatro tipos estruturais de grãos de pólen para a família, com base na análise sob microscopia eletrônica de transmissão: tipos heliantoide, senecioide, arctotoide e antemoide. Mendonça (2006) analisando palinologicamente vários gêneros de Vernonieae confirmou a importância da palinologia para a taxonomia da tribo.

Até os dias de hoje a família Asteraceae é alvo de discussões e novas alterações nos *status* genéricos e infragenéricos e, é sempre apontado o estudo polínico, dentre outros, como uma importante ferramenta na elucidação dos problemas taxonômicos. Assim, o presente estudo objetiva, oferecer subsídios aos taxonomistas para que possam, juntamente com outras características, somar esforços para melhor conhecer os táxons de tão importante e complexa família.

Embora *Praxelis* tenha sido estudado em algumas floras, Barroso (1959), Esteves & Barroso (1996), Esteves (2001), Nakajima (2000), Nakajima *et al.* (2001), até o presente, não foi realizada nenhuma revisão taxonômica do gênero analisando se algumas das características empregadas por King & Rob. (1970) realmente são conservativas nos representantes brasileiros (12 num total de 16 espécies). O maior número de espécies foi revisto por Esteves (2001) e o autor considera que, pelo menos, duas espécies de *Praxelis* devem ser sinonimizadas e uma espécie de *Chromolaena* deverá ser subodinada a *Praxelis* (comunicação pessoal).

Pretende-se, com o desenvolvimento desse projeto, estudar taxonomica e palinologicamente, as espécies brasileiras de *Praxelis* e, para fins comparativos, analisar os demais gêneros componentes da subtribo. Com os dados obtidos, promover a análise multivariada que oferece um modo de estudar a variação

conjunta de dados correlacionados (James & McCullock, 1990) e, por isso, podem ser empregados para analisar, os caracteres morfológicos e polínicos das espécies analisadas.

2. OBJETIVOS

- buscar a existência de caracteres morfológicos importantes a fim de gerar subsídios para estudos taxonômicos e, em um segundo momento, filogenéticos;
- caracterizar a morfologia externa e interna de *Praxelis* e comparar com alguns dos representantes dos demais gêneros da subtribo;
- descrever os grãos de pólen em microscopia óptica, eletrônica de varredura e de transmissão e confeccionar palinogramas;
- caracterizar os tipos polínicos;
- colaborar para a confecção de um catálogo polínico das espécies brasileiras de Asteraceae que possa ser usado por áreas afins, tais como a Aeropalinologia, Melissopalinologia e Paleopalinologia.

3. METODOLOGIA

3.1. ANÁLISE TAXONÔMICA

- levantamento bibliográfico sobre a família Asteraceae, e demais contribuições pertinentes;
- consulta a herbários para análise dos espécimes, atualizações das identificações e para coligir as informações sobre épocas de floração e frutificação, distribuição geográfica, habitat das espécies, nomes populares e usos;
- seleção de caracteres morfológicos diagnósticos a serem utilizados na elaboração da chave de identificação e nas diagnoses dos táxons;
- ilustração botânica de caracteres diagnósticos das espécies;
- elaboração de chave de identificação, descrições e ilustração dos táxons;
- organização dos dados em planilhas;
- análise multivariada dos dados.

3.2. ANÁLISE POLÍNICA

- será obtido a partir de anteras férteis de flores em antese e/ou botões em pré-antese;

- no laboratório o material polínico será acetolisado (Erdtman 1952) com as modificações propostas em Melhem *et al.* (2003);
- mensuração em até sete dias após a acetólise, descrição utilizando microscópio de luz, eletrônico de varredura e de transmissão;
- no material padrão serão mensuradas as vistas polar e equatorial dos grãos de pólen, onde serão tomadas, aleatoriamente, 25 medidas dos diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) em vista equatorial, 10 medidas do diâmetro equatorial em vista polar (DEVP) e lado do apocolpo (LA);
- para cada espécie, serão realizadas dez medidas da abertura, da espessura da exina e dos diâmetros dos grãos de pólen do material de comparação. A medida da exina será feita sempre na região mediana do mesocolpo com o grão de pólen em vista polar. De cada espécime será montada um mínimo de três lâminas permanentes com os grãos de pólen acetolisados de forma a uniformizar a amostra (Salgado-Labouriau *et al.* 1965), nos quais serão tomadas as devidas mensurações, de acordo com o estabelecido por Erdtman (1952) e modificações propostas por Melhem *et al.* (2003);
- os grãos de pólen acetolisados serão medidos até sete dias após sua preparação (Salgado-Labouriau, 1973). As medidas serão feitas em microscópio de luz com oculares nos aumentos de 40 X e 100 X. As lâminas utilizadas no estudo serão depositadas na Palinoteca do Laboratório de Palinologia Álvaro Xavier Moreira, no Departamento de Botânica do Museu Nacional/UFRJ;
- os resultados serão submetidos a tratamento estatístico e os expressos em forma de tabelas;
- terminologia adotada será a de Barth & Melhem (1988) e de Punt *et al.* (2007);
- as fotomicrografias dos grãos de pólen em microscopia de luz serão realizadas com auxílio de câmera digital Canon Power Shot G6 acoplada ao microscópio Zeiss Axiostar Plus, na objetiva de 100X. As ilustrações representarão os grãos de pólen em vista polar e equatorial, detalhando a ornamentação da sexina e, sempre que possível as aberturas.

3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV), as anteras serão maceradas e os grãos de pólen, não acetolisados ou acetolisados quando possível

serão pulverizados sobre suportes recobertos por fita de carbono (Melhem *et al.*, 2003). O conjunto será metalizado com uma camada de ouro puro por cerca de 3 minutos sendo, posteriormente, analisado em aparelho Zeiss DS M960 no Laboratório de Ultraestrutura Celular do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro ou em aparelho Jeol JSM 6390 do Departamento de Invertebrados do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

Para a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as anteras serão desidratadas pela solução de glutaraldeído 2%, incluídas em resina, e cortadas por uma lâmina de diamante em ultra-micrótomo U2088, segundo proposto por Sabatini *et al.* (1963) e Haddad *et al.* (1998).

3.5. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Uma matriz de espécies por atributos polínicos (variáveis quantitativas e qualitativas) será submetida à análise exploratória (análise de agrupamentos, ordenação e teste de nitidez de grupos), para avaliação da variação interespecífica. O índice de Jaccard será utilizado como medida de similaridade entre as espécies. Para análise de agrupamentos será utilizado o critério de *unweighted arithmetic average clustering* (UPGMA), e para a ordenação será utilizado o método de *principal coordinate analysis* (Legendre & Legendre, 1998). Para testar a nitidez dos grupos formados serão aplicados testes de aleatorização (*bootstrap*) com 10.000 replicações usando o aplicativo computacional Multiv v.2.4 (Pillar 2006). A probabilidade da formação de dois ou mais grupos nítidos com $P \geq 0,05$ (Pillar, 1999) será estimada. Para cada análise será avaliada a suficiência amostral pela estabilidade das probabilidades na medida em que aumenta o tamanho da amostra (Pillar, 1999).

4. CRONOGRAMA

Ano / Atividades	Meses											
	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maior	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
2011												
Levantamento bibliográfico								X	X	X	X	X
Cumprimento de Créditos em								X	X	X	X	X
Visita aos herbários								X	X	X	X	X
Tratamento acetolítico								X	X	X	X	X
2012												
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cumprimento de Créditos em			X	X	X	X		X	X	X	X	X
Visita aos herbários	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tratamento acetolítico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tratamento estatístico								X	X	X	X	X
2013												
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tratamento acetolítico	X	X	X	X	X	X	X					
Tratamento estatístico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análise dos resultados						X	X	X	X	X	X	X
Submissão de manuscritos à						X						
2014												
Tratamento acetolítico	X	X	X	X	X	X						
Tratamento estatístico	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Análise dos resultados	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Ilustrações	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Exame de qualificação						X						
Redação final	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Submissão de manuscritos à						X						
2015												
Entrega da Tese				X								
Defesa da Tese								X				

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderberg, A.A., Baldwin, B.G., Bayer, R.J., Breitwieser, I., Jeffrey, C., Dillon, M.O., Eldenäs, P., Funk, V., Garcia-Jacas, N., Hind, D.J.N., Karis, P.O., Lack, H.W., Nesom, G., Nordenstam, B., Oberprieler, C., Panero, J.L., Puttock, C., Robinson, H., Stuessy, T.F., Susanna, A., Urtubey, E., Vogt, R., Ward, J. & Watson, L.E. 2007 [2006]. Compositae. Pp. 61–588 in: Kadereit, J.W. & Jeffrey, C. (eds.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 8, Flowering Plants. Eudicots. Asterales. Springer, Berlin.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399 -436.

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161:105-121.
- Barroso, G.M. 1959. Flora da cidade do Rio de Janeiro - Compositae. *Rodriguésia*, 33-34: 79-147.
- Barth, O. M. & Melhem, T.S. 1988. Glossário Ilustrado de Palinologia. Ed. Unicamp, 75 p.
- Bentham, G. 1873. Asteraceae. *In* *Genera Plantarum*, v. 2, n° 1. G. Bentham & J.D. Hooker. Eds. London. Lovell Reeve & Co. p. 163-533.
- Bremer, K. 1994. Asteraceae: Cladistics and classification. Timber Press, Portland.
- Cronquist, A. 1977. The Compositae revisited. *Brittonia*. 29: 137-240.
- Cronquist, A. 1988. The Evolution and classification of flowering plants. New York. Columbia University Press.
- Devore, M.L. & Stuessy, T.F. 1995. The place and time of origin of the Asteraceae, with additional comments on the Calyceraceae and Goodeniaceae. *In* *Advances in Compositae systematic*. Hind, D.J.N., Jeffrey, C., Pope, G.V. Eds. Richmond. Royal Botanic Gardens, Kew. P. 23-40.
- Erdtman, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy - angiosperms. Almqvist & Wiksell, Stockholm.
- Esteves, R.L. 2001. O gênero *Eupatorium* s.l. (Compositae – Eupatorieae) no Estado de São Paulo – Brasil. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Unicamp, SP.
- Esteves, R.L.; Barroso, G.M. 1996. Compositae. *In*: Lima, M.P.A.; Guedes-Bruni, R.R. (Org.). Reserva ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo - RJ: aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 189-245.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Robinson, H. 2009. Systematics, Evolution, and Biogeography of the Compositae. IAPT (International Association for Plant Taxonomy).
- Haddad, A.; Sesso, A., Attias, M., Farina, M.; Meirelles, M.N.; Silveira, M.; Benchimol, M.; Soares, M.J.; Barth, O.M.; Machado, R.D.; Souto-Padrón, T & Souza, W. 1998. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro.

- Hind, D.J.N. 1993. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil: I. Kew Bulletin 48:245-277.
- James, F. C. & McCulloch, C. E. Multivariate Analysis in Ecology and Systematics: Panacea or Pandora's Box? Annual Review of Ecology and Systematics 21: 129-166. 1990.
- Judd, W.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. Sistemática vegetal – Um enfoque filogenético. Edit. Artmed.
- Judd, W.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2002. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates Inc. Sunderland. 2ª ed. 576pp.
- Judd, W.S.; Campbell, C.S.; Kellogg, E.A. & Stevens, P.F. 1999. Plant Systematics – A phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 464p.
- King, R.M. & Dawson, H.W. 1975. Cassini on Compositae 1-3. Oriole Ed. New York.
- King & Robinson (1970). Studies in Eupatorieae (Compositae). XXVIII. The genus *Praxelis*. Phytologia 20: 193-195
- King, R.M. & Robinson, H. 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 22. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 581p.
- Legendre, P. & Legendre, L. 1998. Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam.
- Melhem, T.S.; Barros, M.A.V.C.; Corrêa, A.M.S.; Makino-Watanbe, H.; Capelato, M.S.F.S.; Gonçalves-Esteves, V. 2003. Variabilidade Polínica em Plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). Boletim do Instituto de Botânica 16:16-104.
- Mendonça, C.B. 2006. Palinotaxonomia de espécies da subtribo Vernoniinae Less. (Vernonieae Compositae Giseke) ocorrentes na região sudeste do Brasil. Rio de Janeiro: Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Botânica Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 155p.
- Nakajima, J. N. 2000. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Unicamp, SP.
- Nakajima, J. N.; Esteves, R.L.; Gonçalves-Esteves, V.; Magenta, M.A.G.; Bianchini, R.S.; Pruski, J.F.; Hind, D.J.N. 2001. Flora Fanerogâmica (Parque Estadual das Fontes do Ipiranga): 159-Asteraceae. Hoehnea (São Paulo), São Paulo, 28(2):111-181.

- Panero, J.L. & Funk, V.A. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115(4): 909-922.
- Pillar, V. D. 1999. How sharp are classification? *Ecology*, 80(8): 2508–2516.
- Pillar, V. D. 2006. MULTIV; Multivariate Exploratory Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling. *User's Guide* 2(4). 51p.
- Punt, W., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. 2007. Glossary of pollen and spore terminology.
- Sabatini, D.D.; Bensch, K. & Barnett, R.J. 1963. Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *Journal of Cellular Biology* 17:19-58.
- Salgado-Labouriau, M.L. 1973. Contribuição à palinologia dos cerrados. *Academia Brasileira de Ciências*. 291 p.
- Salgado-Labouriau, M.L.; Vanzolini, P.E. & Melhem, T.S. 1965. Variation of polar axes and equatorial diameters in pollen grains of two species of *Cassia*. *Grana palynologica* 6: 166-176 p.
- Skvarla, J.J., Turner, B.L. 1966. Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen - a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 53:220-256.
- Stix, E. 1960. Pollenmorphologische untersuchungen an Compositen. *Grana Palynologica* 2:41-104.
- Wagenitz, G. 1976. Systematics and phylogeny of the Compositae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 125:29-46.