

MORFOLOGIA E ANATOMIA DAS FLORES, FRUTOS E PLÂNTULAS DE ESPÉCIES INVASORAS DE ASTERACEAE

LUIZ ANTONIO DE SOUZA, KÁTHIA SOCORRO MATHIAS MOURÃO, ADRIANA LENITA MEYER ALBIERO, DANIELA DIAS PINTO, LUCIANE DA SILVA SANTOS E MICHELLI FERNANDES BATISTA

Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Maringá, Paraná

RESUMO

As espécies invasoras ou daninhas de Asteraceae, objetos do estudo, podem ser consideradas, sob o ponto de vista botânico-ecológico, como “plantas pioneiras”, ou plantas evolutivamente desenvolvidas para ocupação de áreas onde, por algum motivo, a vegetação original foi profundamente alterada, ocorrendo grande disponibilidade de nichos ao crescimento vegetal. Para execução do projeto foram selecionadas algumas espécies dessa família, como *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, *Cosmos sulphureus* Cav., *Crepis japonica* (L.) Benth., *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Elephantopus mollis* Kunth, *Emilia sonchifolia* (L.) DC., *Erechtites valerianifolius* (Link ex Spreng.) DC., *Galinsoga quadriradiata* Ruiz & Pav., *Parthenium hysterophorus* L., *Praxelis clematidea* R. M. King & H. Rob., *Siegesbeckia orientalis* L. e *Tridax procumbens* L. O estudo morfoanatômico dessas espécies será feito com flores, frutos e sementes em desenvolvimento e a plântula. O material botânico (flores, botões florais e frutos em diferentes fases de desenvolvimento) dessas espécies será coletado em terrenos baldios, em culturas agrícolas, em quintais de residências e em formações vegetais de Parques Estaduais do Estado do Paraná. Os diferentes estágios das plântulas serão obtidos em casa de vegetação, mediante germinação das sementes em laboratório e posterior desenvolvimento em solo preparado. O material botânico reprodutivo e plântulas serão fixados em FAA 50 ou glutaraldeído. As seções anatômicas desse material serão obtidas à mão livre e em micrótomo de rotação, segundo técnicas usuais em anatomia vegetal. As flores, frutos (pericarpo e semente) em desenvolvimento e plântulas serão analisados, com base em bibliografia especializada, e ilustrados com desenhos executados ao microscópio equipado com câmara clara e/ou fotomicrografias, obtidas mediante captura de imagens em microscópio de luz com câmera digital. O material reprodutivo e as folhas das plântulas também serão investigados mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados a serem obtidos, divulgados por meio de publicações científicas, poderão ser úteis para preservação/manejo de plantas invasoras ou daninhas, para ampliação do conhecimento científico na área de Botânica Estrutural, e para finalidade taxonômica.

Palavras-chave – estrutura, ultraestrutura, perianto, androceu, gineceu, pericarpo, tegumento seminal, heterofilia

1 – Introdução

As espécies vegetais invasoras ou daninhas designam plantas que crescem, espontaneamente, em solos agrícolas, pátios, beira de estradas, ambientes aquáticos, e plantas parasitas. Essas plantas também são conhecidas como silvestres, matos, inços, infestantes e ruderais (Lorenzi, 1982). Lorenzi (2008), que prefere o uso da denominação “plantas daninhas”, considera, ainda, que esses diferentes nomes, empregados nas literaturas agrícola e botânica brasileira têm gerado confusões e controvérsias a respeito de seus conceitos.

As plantas invasoras ou daninhas se tornaram naturalmente selecionadas para condições adversas, sendo mais aptas que as plantas cultivadas em adquirir os elementos vitais para sua sobrevivência. O conteúdo médio das plantas daninhas é de, aproximadamente, duas vezes mais nitrogênio, 1,6 vezes mais fósforo, 3,5 vezes mais potássio, 7,6 vezes mais cálcio e 3,3 vezes mais magnésio que as plantas cultivadas em geral. A seleção imposta pela natureza não apenas dotou as plantas invasoras ou daninhas de uma grande agressividade, mas também de outros mecanismos de sobrevivência, como grande produção de sementes, processos eficientes de dispersão de sementes (diásporos) e grande longevidade de sementes (Lorenzi, 1982, 2008).

Na agricultura, um dos principais problemas é a presença de plantas daninhas na lavoura, em que são registradas perdas consideráveis de plantas cultivadas. Em cereais e hortaliças, as perdas decorrentes da presença de plantas daninhas podem chegar a 100%, enquanto que, em culturas de espécies florestais e frutíferas, as perdas são menores (Radosevich *et al.*, 1997). O controle de plantas daninhas pode ser feito pelo uso de herbicidas e pelo processo da alelopatia (Balbinot Junior, 2004).

O estudo estrutural de órgãos reprodutivos constitui um capítulo primordial na compreensão e no conhecimento das etapas de desenvolvimento de uma planta, da preservação e controle de espécies, do aproveitamento econômico e sustentado pelo homem e da elaboração de projetos voltados para a investigação ecológica. Webberling (1992) ressalta a importância da morfologia da flor na sistemática. Souza (2006, 2009) registrou a essencialidade da investigação da morfologia e anatomia de frutos, sementes e plântulas na colonização de novos ambientes por espécies nativas ou exóticas, no controle de plantas invasoras em culturas vegetais e na pesquisa de plantas medicinais e tóxicas.

Asteraceae conta com aproximadamente 1535 gêneros e 23000 espécies, sendo que muitas dessas plantas são invasoras (Judd *et al.*, 2002). No Brasil a família está bem representada, ocorrendo cerca de 300 gêneros e 2000 espécies (Souza & Lorenzi, 2005).

Asteraceae forma um grupo monofilético com três subfamílias: Barnadesioideae, um pequeno grupo da América do Sul composto principalmente por espécies arbóreas e abustivas; Cichorioideae, caracterizada por ramos do estilete com a superfície estigmática

interna, e presença de canais resiníferos e laticíferos; e Asteroideae, que se caracteriza pela restrição do tecido estigmático a duas linhas marginais em cada ramo do estilete, perda de laticíferos, presença de flores do raio, e flores do disco com lobos curtos. Os caracteres morfológicos relevantes taxonomicamente para separação de tribos são: características dos ramos do estilete (localização da região estigmática, presença de pelos ou apêndices estéreis, comprimento e largura, e forma do ápice), forma do papus, formato e anatomia da corola, morfologia do pólen, caracteres morfológicos e anatômicos dos aquênios (cipselas), anatomia e formato das anteras, arranjo foliar, e presença ou ausência de espinhos nodais ou marginais (Judd *et al.*, 2002).

Na literatura registram-se vários trabalhos referentes à estrutura floral de Asteraceae, como a estrutura do endotécio de 22 espécies de *Inula* L. e gêneros relacionados como *Pentanema* Cass., *Duhaldea* DC., *Dittrichia* Greuter e *Iphiona* Cass. (Abid & Qaiser, 2004); a investigação sobre o tipo, a morfologia e a distribuição de cristais de oxalato de cálcio em órgãos florais de *Helianthus annuus* L. e *Helianthus tuberosus* L. (Meric & Dane, 2004); a anatomia e ultraestrutura do nectário floral de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (Wist & Davis, 2006) e de *Inula helenium* L. (Sulborska & Weryszko-Chmielewska, 2007); a análise de microcaracteres da superfície do ovário, especialmente tricomas glandulares bisseriados, de 34 espécies pertencentes às Asteroideae (Ciccarelli *et al.*, 2007); e o estudo comparativo da esporogênese, gametogênese e o desenvolvimento de estruturas esporofíticas em três híbridos de *Helianthus annuus* (Gotelli *et al.*, 2008).

Os estudos do fruto de Asteraceae foram realizados por Pandey & Singh (1980), Pandey *et al.* (1983), Puttock (1994), Martins & Oliveira (2007), Bruhl & Quinn (2008), Herman (2008), Zarembo & Boyko (2008), Julio & Oliveira (2009), Galastri & Oliveira (2010), Marzinek & Oliveira (2010). Ressalta-se, ainda, que a classificação dos frutos de Asteraceae é motivo de controvérsia na literatura. Muitos autores, como Roth (1977), Spjut (1994), Barroso *et al.* (1999), Judd *et al.* (2002) consideram o fruto como aquênio. Por outro lado, Marzinek *et al.* (2008), em estudo de revisão histórica e anatômica sobre frutos de Asteraceae, adotam o termo cipsela, principalmente com base na origem do ovário ínfero.

O estudo estrutural de plântulas de Asteraceae é escasso, podendo ser mencionada a investigação da plântula de *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme (vassourão-branco), uma espécie arbórea característica e exclusiva da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária) (Kellermann, 2010).

2 – Justificativas

Interesse econômico

A presença de plantas invasoras (daninhas) em lavouras é considerada um problema para os agricultores, em razão da diminuição considerável na produção de cereais, hortaliças, espécies florestais e plantas frutíferas. Quando é atingido o nível de dano econômico na produção vegetal há necessidade de utilização de práticas de controle dessas plantas. O método de controle empregado pelo homem é químico, que pode provocar sérios riscos de contaminação do meio ambiente e do homem.

As plantas invasoras, pertencentes a várias famílias botânicas, também podem ter interesse medicinal. Na literatura há inúmeros exemplos de plantas invasoras que são utilizadas pelo homem como fitoterápicos. Alguns exemplos podem ser fornecidos por *Galinsoga parviflora* Cav., *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. e *Vernonia ferruginea* Less., que são plantas empregadas na medicina caseira.

Interesse ecológico

As espécies invasoras são dotadas de atributos especiais que facilitam sua sobrevivência no meio terrestre e aquático. Elas têm grande agressividade competitiva, produzem enorme quantidade de sementes com grande longevidade e os diásporos têm mecanismos eficientes de dispersão. Com essas características, as plantas invasoras podem ocupar os mais diferentes ambientes, podendo interferir nas culturas agrícolas, no processo de sucessão vegetal e na disseminação de doenças e pragas, servindo como hospedeiros intermediários de nematoides, vírus e fungos.

Interesse botânico

A domesticação de espécies vegetais e animais interessa ao homem desde os tempos imemoriais. O conhecimento botânico é fonte básica para que o homem exerça esse domínio sobre a natureza, em especial dos vegetais. O conhecimento sobre órgãos reprodutivos, sobre a germinação e sobre o desenvolvimento inicial de uma planta é fundamental para o conhecimento de uma espécie, visando seu controle e aproveitamento. A investigação das estruturas florais, dos frutos, das sementes e das plântulas de uma espécie gera conhecimentos que são indispensáveis na domesticação dessa planta.

Interesse taxonômico

Os caracteres florais e de frutos, como a morfologia dos estiletos e estigmas, formato do papus, formato e anatomia da corola, a morfologia do pólen, a estrutura das cipselas (aquênios), e a estrutura das anteras, têm interesse taxonômico para identificação de tribos de Asteraceae.

3 - Objetivos

Objetivo geral

O projeto tem por objetivo o estudo morfoanatômico (microscopia de luz e eletrônica de varredura) da flor, fruto (pericarpo e semente) em desenvolvimento e da plântula de espécies invasoras de Asteraceae.

Objetivos específicos

Análise morfoanatômica do perianto, androceu e gineceu das espécies de Asteraceae.

Análise do fruto (pericarpo e semente) em desenvolvimento de espécies de Asteraceae, desde a fase de ovário até fase de fruto completamente maduro.

Investigação estrutural plântula/tirodendro (raiz, hipocótilo, cotilédones, epicótilo, eofilo e metafilo) de espécies de Asteraceae.

Indicação de caracteres estruturais de flores, frutos e de plântulas que têm interesse taxonômico em Asteraceae.

4 – Metodologia (Material e métodos)

4.1. Seleção de espécies

Serão estudadas as flores, frutos e plântulas de várias espécies que ocorrem no Estado do Paraná:

Espécies selecionadas para estudo de flor, fruto e semente

Conyza bonariensis (L.) Cronquist

Cosmos sulphureus Cav.

Eclipta alba (L.) Hassk.

Elephantopus mollis Kunth

Emilia sonchifolia (L.) DC.

Erechtites valerianifolius (Link ex Spreng.) DC.

Galinsoga quadriradiata Ruiz & Pav.

Parthenium hysterophorus L.

Praxelis clematidea R. M. King & H. Rob.

Siegesbeckia orientalis L.

Espécies selecionadas para estudo de plântulas

Cosmos sulphureus Cav.

Crepis japonica (L.) Benth.

Eclipta alba (L.) Hassk.

Elephantopus mollis Kunth

Galinsoga quadriradiata Ruiz & Pav.

Praxelis clematidea R. M. King & H. Rob.

Tridax procumbens L.

4.2. Coleta e fixação de material botânico

Os ramos com flores e frutos das espécies selecionadas serão coletados em terrenos baldios, em culturas agrícolas, em quintais de residências e em formações vegetais de Parques Estaduais no Estado do Paraná. Com esse material botânico coletado serão preparadas exsicatas de cada espécie para depósito e registro no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM) e da Universidade Estadual de Ponta Grossa (HUPG). Também serão coletados ramos com botões florais, flores e frutos em diferentes fases de desenvolvimento de dois ou mais exemplares de cada espécie, que serão utilizados no estudo morfoanatômico floral e na ontogênese dos frutos e sementes.

O material botânico que será usado para estudo estrutural de flores e frutos será colocado em bomba de vácuo para retirada do ar dos tecidos e, posteriormente, fixado em FAA 50 e/ou glutaraldeído. Esse material fixado será em seguida conservado em frascos de vidro com álcool 70% (Johansen, 1940).

Para o estudo das plântulas, serão coletadas cipselas que serão esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 10% por cinco minutos e, após este período, serão imersas em água destilada por cinco minutos. Em seguida, essas cipselas esterilizadas serão semeadas em papel de filtro contido em caixas gerbox ou placas de Petri, previamente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio a 20% durante 20 minutos (Oliveira, 2001). A germinação das sementes ocorrerá em câmara de germinação TE 400 Tecnal, à temperatura constante e sob iluminação fluorescente branca contínua. As cipselas germinadas, caracterizadas pela protrusão da raiz principal, serão transferidas para solo (mistura de solo e substrato orgânico em igual proporção) contido em sacos plásticos. Os sacos com as plântulas serão mantidos em casa de vegetação coberta com sombrite 50%. As plântulas obtidas, em diferentes fases de desenvolvimento, serão fixadas em FAA 50 e/ou glutaraldeído e servirão para análise morfológica e anatômica.

4.3. Análise morfológica

As flores em antese e pré-antese, frutos e sementes serão analisados morfológicamente, mediante terminologia utilizada por Comer (1976), Johri (1984), Weberling (1992), Spjut (1994), Werker (1997), Gonçalves & Lorenzi (2007), Souza (2009a, 2009b) e outros. O estudo da flor, fruto e semente será ilustrado mediante desenhos e/ou fotografias digitais em câmera manual. A ilustração desses órgãos reprodutivos também será feita em microscópio estereoscópico Leica EZ4D com câmera digital embutida, e posterior captação de imagem em computador.

A raiz, hipocótilo, cotilédones, epicótilo e eofilo (s) das plântulas também serão descritos morfológicamente, com base em terminologia adotada por Rizzini (1977) e Souza (2009a, 2009b). As plântulas serão classificadas conforme classificação estabelecida por Vogel (1980) e Garwood (1996).

4.4. Análise anatômica

O estudo anatômico das flores, frutos, sementes e plântulas será feito em seções executadas em diversos planos dos órgãos vegetais, realizadas à mão livre ou então obtidas em micrótomo de rotação.

Com as seções manuais serão montadas lâminas temporárias e lâminas semipermanentes. As seções, após coloração em safranina e azul de astra ou outro corante, serão montadas entre lâmina e lamínula, em água (lâminas temporárias) ou em glicerina a 33%, e lutadas posteriormente, com esmalte incolor (lâminas semipermanentes).

As lâminas permanentes serão confeccionadas com as peças botânicas fixadas, já submetidas à desidratação em série alcoólica etílica, incluídas em glicol-metacrilato (historresina Leica), conforme orientações especificadas no produto, e seccionadas em micrótomo de rotação. As seções assim obtidas serão coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1965) e/ou fucsina básica 0,0125% e azul de astra 1% (Brito & Alquini, 1996). O material botânico também poderá ser emblocado em parafina, seccionado em micrótomo de rotação e corado em hematoxilina de Ehrlich e safranina, segundo técnica descrita em Johansen (1940).

4.5. Testes histoquímicos

Serão realizados testes histoquímicos para determinadas substâncias contidas nas paredes celulares ou no protoplasta das flores, frutos, sementes e plântulas de Asteraceae, como:

Polissacarídeos ácidos (pectinas) – Vermelho de rutênio a 1000ppm (Johansen, 1940), em seções em parafina ou historresina (lâminas temporárias com água destilada);

Amido – Lugol (iodeto de potássio 1,5% e iodo 0,3%) (Johansen, 1940), em seções frescas ou com parafina (lâminas temporárias com lugol);

Mucilagens – Ácido tânico a 5% e cloreto férrico a 3% (Pizzolato & Lillie, 1973), seções em historresina (lâminas semipermanentes); controle com ácido tânico;

Lipídios totais – Sudan Black B 1% em etano 70% (Jensen, 1962), seções em historresina (lâminas semipermanentes); controle com metanol/clorofórmio/água/ácido clorídrico (MCAA) (66:33:4:1), antes da fixação;

Substâncias lipofílicas – Sudan III ou sudan IV 1% em etanol 70% (Jensen, 1962), seções em historresina (lâminas semipermanentes); controle MCAA;

Compostos fenólicos totais – Sulfato ferroso 2% em formalina 4% (Johansen, 1940), seções em historresina (lâminas permanentes); controle com metanol, antes da fixação;

Taninos (compostos fenólicos) – Vanilina 0,5% em ácido clorídrico 9% (Mace & Howel, 1974), seções em historresina (lâminas temporárias montadas com ácido clorídrico a 9%); controle vanilina clorídrica;

Lignina (composto fenólico) – Floroglucinol 1% em ácido clorídrico 20% (Johansen, 1940), seções em parafina ou historresina (lâminas temporárias com água destilada).

4.6. Diafanização

O gineceu, ovário ou óvulo poderão ser diafanizados conforme método de Herr (1971), Smith (1973) ou French (1987).

O estudo da vascularização nas plântulas será também feito mediante processo da diafanização. O eixo da plântula, compreendendo raiz, hipocótilo e epicótilo, será diafanizado mediante método usado para folhas.

As folhas das plântulas (cotilédones, eofilos e metafilo ou nomofilo) serão diafanizadas para identificação do padrão de venação. O método utilizado se baseará nas técnicas modificadas de Foster (1950) e Shobe & Lersten (1967). As folhas frescas das plântulas serão mantidas em etanol 70% durante 12 a 24 horas para remoção parcial de pigmentos. Em seguida, as folhas serão imersas em solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 20% por 24 horas, sendo posteriormente lavadas em água destilada por cinco a dez vezes, até a remoção dos pigmentos. Em sequência, as folhas serão transferidas para solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 20%, permanecendo entre 12 e 36 horas, até a clarificação total. O material será lavado em água destilada e desidratado em série etílica (50%, 95% e 100%). As folhas serão coradas em solução de safranina contendo volumes iguais de álcool absoluto e xilol, por cerca de 10 a 20 minutos. Logo a seguir, as folhas serão descoradas numa mistura de álcool absoluto e xilol ou álcool acidificado. Quando a diferenciação do sistema vascular for satisfatória, as folhas serão colocadas em xilol puro por 15 a 30

minutos. A montagem é feita entre placas de vidro de quatro a seis milímetros com resina sintética (Entellan ou equivalente). A descrição do padrão de venação será feita conforme terminologia adotada por Hickey (1979).

4.7. Dissociação da epiderme

Será retirada uma amostra de aproximadamente 4cm² da parede do ovário, fruto e do limbo das folhas das flores e das plântulas, que será colocada em solução aquosa contendo álcool etílico a 70%. A dissociação da epiderme será realizada colocando-se a amostra num frasco com ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio (1:1) (técnica de Franklin, 1945, modificada). O frasco será mantido em estufa à temperatura de 60°C por 12 horas ou pelo tempo necessário para dissociação da epiderme. A epiderme dissociada será lavada em água destilada, colocada em lâmina e corada com safranina. Finalmente, será montada em glicerina a 33% e lutada com esmalte incolor (lâmina semipermanente).

4.8. Dissociação de tecidos (maceração)

O pericarpo e a semente maduros deverão ter seus tecidos dissociados por maceração, colocando-se fragmentos de frutos e sementes em solução de água oxigenada a 20 v e ácido acético glacial (1:1), numa estufa à temperatura de 60°C (Kraus & Arduin, 1997). O material dissociado será lavado em água, corado com azul de astra e fucsina básica e montado em glicerina a 33% ou gelatina glicerinada.

4.9. Ilustração

A ilustração anatômica será feita mediante desenhos elaborados ao microscópio binocular Willd., com auxílio de câmara clara, ou fotomicrografias. Estas serão obtidas por captura de imagem por câmera digital acoplada a microscópio binocular Leica ICC50 e Olympus BX50. As escalas referentes às ilustrações serão obtidas com lâmina micrométrica nas mesmas condições ópticas utilizadas para cada caso.

4.10. Análise em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A análise do perianto, ovários, óvulos, estames, frutos, sementes e folhas (cotilédones, eofilos e metafilos) das várias espécies será feita em amostras fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), desidratadas em série etílica e, em seguida, secas ao ponto crítico de CO₂ (Horridge & Tamm, 1969). Em seguida, as amostras serão montadas sobre suportes de alumínio e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm.

A análise ultraestrutural será feita em microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Shimadzu SS 550, com as escalas das micrografias eletrônicas diretamente impressas nas mesmas. A descrição das camadas cuticulares será realizada de acordo com a padronização proposta por Barthlott *et al.* (1998).

5 - Resultados Esperados

- ⇒ Serão identificados atributos florais, relativos ao estigma, papus, corola e anteras, e carpológicos na caracterização das diferentes espécies e suas respectivas tribos.
- ⇒ Os tricomas das cípselas das espécies selecionadas para estudo devem ter valor taxonômico.
- ⇒ Todas as espécies a serem estudadas devem apresentar depósito de fitomelanina no pericarpo, como sinapomorfia identificada em Asteraceae.
- ⇒ A estrutura do carpopódio deve ser diferente nas espécies e deve ter valor taxonômico na família.
- ⇒ Todas as espécies devem apresentar colapso da endotesta e parte da mesotesta durante a ontogênese da semente.
- ⇒ As espécies a serem investigadas não devem apresentar tegumento seminal especializado.
- ⇒ As plântulas das espécies a serem estudadas devem ser fanerocotiledonares e epigeias, e devem se enquadrar nos tipos Macaranga de Vogel (1980) e PEF de Garwood (1996).
- ⇒ A região de transição raiz/caule de todas as espécies deve enquadrar-se no tipo alto de Compton (1912).

6 - Referências (Conforme Normas da ABNT)

- Abid, R.; Qaiser, M. The endothecium in *Inula* L., and its allied genera (Inuleae – Compositae) from Pakistan and Kashmir. **Pakistan Journal of Botany** v. 36, n. 3, p. 481-486, 2004.
- Balbinot Junior, A. A. Manejo das plantas daninhas pela alelopatia. **Agropecuária Catarinense** v. 17, n.1, p. 61-64, 2004.
- Barroso, G.M.; Morim, M.P.; Peixoto, A.L.; Ichaso, C.L.F. **Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, 1999.
- Barthlott, W.; Neinhuis, C.; Cutler, D.; Ditsch, F.; Meusel, I.; Theisen, I.; Wilhelmi, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of Linnean Society** v. 126, p. 237-260, 1998.

- Brito, C.J.F.; Alquini, Y. A new method for staining botanical material embedded in glycol methacrylate (GMA). **Arquivos de Biologia e Tecnologia** v. 39, n. 4, p. 949-951, 1996.
- Bruhl, J.J.; Quinn, C.J. Cypsela anatomy in the 'Cotuleae' (Asteraceae-Anthemideae). **Botanical Journal of the Linnean Society** v. 102, p. 37-59, 2008.
- Ciccarelli, D.; Garbari, F. Pagni, A.M. Glandular hairs of the ovary: a helpful character for Asteroideae (Asteraceae) taxonomy. **Annales Botanici Fennici** v. 44, p. 1-7, 2007.
- Compton, R.H. Investigation of the seedling structure in the Leguminosae. **Journal Linnean of Society** v. 41, p. 1-122, 1912.
- Corner, E.J.H. **The seeds of dicotyledons**. Vol. 1 and 2. Cambridge: Cambridge University Press, 1976.
- Foster, A.S. Techniques for the study of venation patterns in the leaves of angiosperms. **Proceedings of the Seventh International Botanical Congress** p. 586, 1950.
- Franklin, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature** v. 155, p. 51, 1945.
- French, J. C. Structure of ovular and placental trichomes of Araceae. **The Botanical Gazzete** v. 148, n.2, p. 198-208, 1987.
- Galastri, N.A.; Oliveira, D.M.T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Vernonia platensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica** v. 24, p. 73-83, 2010.
- Garwood, N.C. 1996. Functional morphology of tropical tree seedlings. In: Swaine, M.D. (ed.) **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Paris: The Parthenon Publishing Group, 1996.
- Gonçalves, E. G.; Lorenzi, H. **Morfologia vegetal (organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2007.
- Gotelli, M.M.; Galati, B.G.; Medan, D. Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae). **Annales Botanici Fennici** v. 45, p. 81-96, 2008.
- Herman, P.P.J. Synopsis of the genus *Rennera merxm* (Asteraceae, Anthemideae) with description of a new species from South Africa. **Botanical Journal of the Linnean Society** v. 129, p. 367-377, 2008.
- Herr, J. M. Jr. A new clearing-squash technique for study of the ovule development in angiosperms. **American Journal of Botany** v. 58, n. 8, p. 785-790, 1971.
- Hickey, L.J. A revised classification of the architecture of dicotyledonous leaves. In: Metcalfe, C.R.; Chalk, L. (eds.) **Anatomy of the dicotyledons (systematic anatomy of leaf and stem, with brief history of the subject)**. Oxford: Clarendon Press, 1979.
- Horrige, G.A.; Tamm, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science** v. 163, p. 817-818, 1969.

- Jensen, W.A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: W. F. Freeman and Company, 1962.
- Johansen, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940.
- Johri, B. M. (ed.) **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer-Verlag, 1984.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. **Plant systematics – a phylogenetic approach**. 2nd Edition. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- Julio, P.G.S.; Oliveira, D.M.T. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica** v. 32, p. 109-116, 2009.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology** v. 27, p. 137-138, 1965.
- Kraus, J.E.; Arduin, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Universidade Rural, 1997.
- Kellermann, B. **Monitoramento da regeneração natural em fragmento de floresta ombrófila mista e morfoanatomia de plântulas e tirodendros de *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme (Asteraceae)**. Dissertação de mestrado. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.
- Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil (terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais)**. Nova Odessa: Edição do autor, 1982.
- Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil (terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas)**. 4^a edição. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- Mace, M.E.; Howell, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursors in roots of cotton seedlings. **Canadian Journal of Botany** v. 52, p. 2423-2426, 1974.
- Martins, M.A.G.; Oliveira, D.M.T. Morfoanatomia comparada dos frutos em desenvolvimento de *Vernonia brevifolia* Less. e *V. herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica** v. 30, p. 99-110, 2007.
- Marzinek, J.; De-Paula, O.C., Oliveira, D.M.T. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. **Revista Brasileira de Botânica** v. 31, p. 549-553, 2008.
- Marzinek, J.; Oliveira, D.M.T. Structure and ontogeny of the pericarp of six Eupatorieae (Asteraceae) with ecological and taxonomic considerations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 82, p. 279-291, 2010.
- Meric, C.; Dane, F. Calcium oxalate crystals in floral organs of *Helianthus annuus* L. and *H. tuberosus* L. (Asteraceae). **Acta Biologica Szegediensis** v. 48, n. 1-4, p. 19-23, 2004.
- O'Brien, T.P.; Feder, N.; McCully, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** v. 59, p. 368-373, 1964.

- Oliveira, D.M.T. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira de Botânica** v. 24, p. 85-97, 2001.
- Pandey, A.K.; Singh, R.P. Development and structure of seeds and fruits in tribe Vernonieae – some *Vernonia* and *Elephantopus* species. **Flora** v. 169, p. 443-452, 1980.
- Pandey, A.K.; Chopra, S.; Singh, R.P. Development and structure of seeds and fruits in Compositae, tribe Inuleae. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Plant Sciences** v. 92, p. 467-471, 1983.
- Pizzolato, T.D; Lillie, R.D. Mayer's tannic acid-ferric chloride stain for mucins. **Journal of Histochem & Cytochemistry** v. 21, p. 56-64, 1963.
- Puttock, C.F. Anatomy and morphology of *Cremnothamnus* (Asteraceae) a new genus for *Helichrysum thomsonii*. **Australian Systematic Botany** v. 7, p. 569-583, 1994.
- Radosevich, S.; Holt, J.; Ghersa, C. **Weed ecology**. 2nd edition. New York: Wiley, 1997.
- Rizzini, C. T. Sistematização terminológica da folha. **Rodriguésia**, v. 29, n.42, p. 103-125, 1977.
- Roth, I. Fruits of angiosperms. In: Linsbauer, K.; Tischler, F.G.; Pascher, A. (eds.) **Encyclopedia of plant anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1977.
- Shobe, W.R.; Lersten, N.R. A technique for clearing and staining gymnosperm leaves. **Botanical Gazette** v. 128, p. 150-152, 1967.
- Smith, B. B. The use of a new clearing technique for the study of early ovule development, megasporogenesis, and megagametogenesis in five species of *Cornus* L. **American Journal of Botany** v. 60, n.4, p. 322-338, 1973.
- Souza, L.A. **Morfologia e anatomia vegetal (célula, tecidos, órgãos e plântulas)**. Ponta Grossa: Editora Universidade de Ponta Grossa, 2009a.
- Souza, L.A. (org.) **Anatomia do fruto e da semente**. Ponta Grossa: Editora Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006.
- Souza, L.A. (org.) **Sementes e plântulas – germinação, estrutura e adaptação**. Ponta Grossa: Todapalavra Editora, 2009b.
- Souza, V.C.; Lorenzi, H. **Botânica sistemática (guia ilustrado para identificação das famílias da flora brasileira, baseado em APG II)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.
- Spjut, R.W. A systematic treatment of fruit types. **Memoirs of the New York Botanical Garden** v. 70, p. 1-182, 1994.
- Sulborska, A.; Weryszko-Chmielewska, E. Anatomy and ultrastructure of floral nectary of *Inula helenium* L. (Asteraceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** v. 76, n. 3, p. 201-207, 2007.
- Vogel, E. F. **Seedlings of dicotyledons (structure, development, types)**. Wageningen: Pudoc/Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1980.

Weberling, F. **Morphology of flowers and inflorescences**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.

Werker, E. **Seed anatomy**. Berlin: Gebrüder Borntraeger, 1997.

Wist, T.J.; Davis, A.R. Floral nectar production and nectary anatomy, and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Annals of Botany** v. 97, p. 177-193, 2006.

Zarembo, E.V.; Boyko, E.V. Carpology of some East Asian Cardueae (Asteraceae). **Anales del Jardín Botánico de Madrid** v. 65, p. 129-134, 2008.

7. Cronograma de execução (2012 A 2015)

7.1. Cronograma 2012

Cronograma de execução/2012*	
Mês/Ano	Atividades a serem desenvolvidas no projeto
Jun/2012	Revisão bibliográfica. Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico.
Jul/2012	Revisão bibliográfica. Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Ago/2012	Revisão bibliográfica. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes. Germinação de sementes e obtenção de plântulas.
Set/2012	Revisão bibliográfica. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes. Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Análise morfológica das plântulas.
Out/2012	Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Análise morfológica das plântulas. Ilustração morfológica das plântulas.
Nov/2012	Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Dez/2012	Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.

7.2. Cronograma de 2013

Cronograma de execução/2013*	
Mês/Ano	Atividades a serem desenvolvidas no projeto
Jan/2013	Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico.

Fev/2013	Revisão bibliográfica. Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Mar/2013	Revisão bibliográfica. Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Abr/2013	Revisão bibliográfica. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Mai/2013	Revisão bibliográfica. Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Jun/2013	Revisão bibliográfica. Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Jul/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Ago/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Set/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Out/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Nov/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Dez/2013	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.

7.3. Cronograma de 2014

Cronograma de execução/2014*	
Mês/Ano	Atividades a serem desenvolvidas no projeto
Jan/2014	Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico.
Fev/2014	Revisão bibliográfica. Coleta e fixação de material botânico. Herborização de material botânico. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Mar/2014	Revisão bibliográfica. Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.
Abr/2014	Revisão bibliográfica. Germinação de sementes e obtenção de plântulas. Confecção de lâminas semipermanentes e permanentes. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Mai/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Jun/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Jul/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Ago/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Set/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica. Redação de trabalho científico.
Out/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Nov/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Dez/2014	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.

7.4. Cronograma de 2015

Cronograma de execução/2012*	
Mês/Ano	Atividades a serem desenvolvidas no projeto
Jan/2015	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Fev/2015	Revisão bibliográfica. Análise morfoanatômica da flor, da plântula, do fruto e da semente. Ilustração morfológica e anatômica.
Mar/2015	Revisão bibliográfica. Redação de trabalho científico
Abr/2015	Revisão bibliográfica. Redação de trabalho científico.
Mai/2015	Redação de trabalho científico. Redação do relatório final.

8 – Orçamento

8.1. Material de Consumo

Especificação	Qtde.	Valor Unitário	Valor Total
Kit de historresina Leica (Embedding kit)	2 kits	1150,00	2300,00
Histomolde (molde de plástico para emblocamento de material em historresina (6 x 8mm))	1 pacote	450,00	450,00
Glutaraldeído 25% em água PA	2 litros	70,00	140,00
Safranina T (25g)	1 frasco	45,00	90,00
Azul de toluidina	1 frasco	120,00	120,00
Ácido acético	1 litro	20,00	20,00
Formaldeído (solução PA)	1 litro	15,00	15,00
Xilol (xileno PA)	1 litro	25,00	25,00
Álcool etílico absoluto	10 litros	5,00	50,00
Lamínulas (24 x 60mm)	3 caixas	6,00	18,00
Lamínulas (22 x 22mm)	2 caixas	7,00	14,00
Lâminas para microscopia lisa	10 caixas	5,00	50,00
Frascos de vidro para fixação e conservação de material botânico (diversos tamanhos)	20 unidades	2,00 (valor médio)	40,00
Porta-lâminas de plástico para 100 lâminas (Plast Bio)	4 caixas	10,00	40,00
Peróxido de hidrogênio	1 frasco	20,00	20,00
Hidróxido de sódio	1 frasco	50,00	50,00
Hipoclorito de sódio	1 litro	5,00	5,00
Floroglucina	1 frasco	80,00	80,00
Vanilina	1 frasco	90,00	90,00
Sudan III	1 frasco	70,00	70,00
Sudan black	1 frasco	120,00	120,00
Ácido tânico	1 frasco	60,00	60,00
Vermelho de rutênio	1 frasco	100,00	100,00
Total			3967,00

8.2. Equipamentos e Material Permanente

Especificação	Qtde.	Valor Unitário	Valor Total
*Micrótopo de rotação	1	22000,00	22000,00
*Micrótopo de deslize	1	20000,00	20000,00
*Microscópio de luz Leica	1	25000,00	25000,00
*Microscópio estereoscópio Leica	1	12000,00	12000,00
*Microscópio de luz Willd M20	1	10000,00	10000,00
**Estufas bacteriológicas	2	3000,00	6000,00
Total			95000,00

Obs. - *Equipamentos disponíveis no DBI.

**Deverá ser adquirida uma estufa no período (R\$3000,00).

8.3. Serviços de Terceiros – Pessoa Física e Pessoa Jurídica

Especificação	Qtde.	Valor Unitário	Valor Total
Total			

8.4 Fontes de Recursos

Discriminação	UEM/Depto.	Outra fonte	Total
Material de Consumo		*4000,00	4000,00
Equipamentos e Material Permanente	**92000,00	*3000,00	95000,00
Serviços de Terceiros e Encargos Diversos			
Total			99000,00

Obs. - *CNPq (Taxa de bancada/Bolsa Produtividade em Pesquisa)/Recursos do PGB

**Recursos disponíveis no DBI

8.5 Cronograma de Desembolso

Elementos de Despesas/Fontes de Recursos	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Total
UEM/Departamento				
Material de Consumo				
Equipamentos e Material Permanente				
Serviços de Terceiros e Encargos Diversos				
<i>Sub-total</i>				
Outras fontes				
Material de Consumo	2000,00	2000,00		
Equipamentos e Material Permanente		3000,00		
Serviços de Terceiros e Encargos Diversos				
<i>Sub-total</i>				
TOTAL	2000,00	5000,00		7000,00