

Projeto de Tese de Doutorado

Morfoanatomia dos órgãos reprodutivos em *Psychotria* L. e *Palicourea* Aubl.  
(Rubiaceae) e sua contribuição para a sistemática da aliança Psychotrieae

Doutorando: Rhaniel Nicholas Lisowski Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araújo Mariath.

Porto Alegre

2019

## RESUMO

A Aliança Psychotrieae representa um grupo monofilético, da subfamília Rubioideae (Rubiaceae), com grande riqueza de espécies. É composto por aproximadamente 3400 espécies distribuídas em nove tribos. As tribos Psychotrieae e Palicoureeae formam um clado que alberga 91% das espécies do grupo. Apesar do monofiletismo da aliança, as relações internas das duas tribos permanecem incertas, devido ao grande número de espécies que as compõem e ausência de caracteres diagnósticos. Dessa forma, uma ferramenta que pode fornecer subsídios que auxiliem as filogenias moleculares na delimitação desses grupos pode ser a morfoanatomia dos órgãos reprodutivos. Na execução do presente projeto, pretendemos utilizar dados relacionados a estrutura anatômica de flores, desenvolvimento de frutos e sementes, além de analisar os aspectos embriológicos de micro- e megasporogênese e micro- e megagametogênese, utilizando os resultados na sistemática da aliança Psychotrieae. Serão analisadas seis espécies pertencentes aos gêneros *Psychotria* L. e *Palicourea* Aubl. As amostras serão processadas e coradas utilizando metodologias padronizadas em anatomia vegetal para observação em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Com isso, esperamos observar sinapomorfias que apresentem valor taxonômico e que possam ser usados como subsídios em futuros estudos taxonômicos da aliança Psychotrieae, em especial no clado Psychotrieae + Palicoureeae. Ainda, esperamos contribuir para o entendimento da biologia reprodutiva e dos processos embriológicos das espécies analisadas.

**Palavras-chave:** Anatomia floral; anatomia do pericarpo; embriologia vegetal; Gentianales; Rubioideae.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aliança Psychotrieae

A Aliança Psychotrieae, pertencente à subfamília Rubioideae (Rubiaceae Juss.), configura um grupo monofilético, de distribuição pantropical, com grande riqueza de espécies. Atualmente, é composta por aproximadamente 3400 espécies, distribuídas em nove tribos: Craterispermeae Verde., Gaertnereae Bremek. ex Darwin, Mitchelleae Razafim. & B. Bremer, Morindeae Miq., Palicoureeae Robbr. & Manen, Prismatomerideae Ruan, Psychotrieae Cham. & Schltl., Schizocoleae C.Rydin & B. Bremer, e Schradereae Bremek (Razafimandimbison *et al.* 2014; Razafimandimbison *et al.* 2017).

As tribos Psychotrieae e Palicoureeae são consideradas as mais expressivas, formando um clado que compreende cerca de 91% das espécies da aliança e 24% do total da família Rubiaceae. Ambos são considerados grupos irmãos, proximamente relacionados, baseados em dados moleculares de nDNA cpDNA (Razafimandimbison *et al.* 2014; Razafimandimbison *et al.* 2008). As principais diferenças morfológicas entre os membros de tais tribos incluem: estípulas decíduas em Psychotrieae e persistentes em Palicoureeae, substâncias solúveis em álcool no tegumento da semente (presente e ausente, respectivamente), coloração das sementes secas (marrom à cinza e verde), além de algumas diferenças bioquímicas, como a presença de ciclotideos em Palicoureeae (Robbrecht & Manen, 2006).

*Psychotria* L. e *Palicourea* Aubl. são, respectivamente, os gêneros mais representativos do clado formado pelas duas tribos. O primeiro, composto por aproximadamente 1800 espécies, é considerado o maior gênero de Rubiaceae e um dos maiores entre as angiospermas (Nepokroff *et al.* 1999). Suas espécies apresentam uma enorme diversidade morfológica, mas algumas características comuns podem ser destacadas, tais como: folhas opostas; presença de estípulas interpeciolares; inflorescências cimosas e terminais; corola valvada, com flores normalmente brancas e actinomorfas; estames fusionados no tubo da corola; ovário bilocular, com um rudimento seminal por lóculo; frutos carnosos e drupáceos (Nepokroff *et al.* 1999; Barrabé, 2014). Este gênero é considerado parafilético e taxonomicamente complexo, devido ao grande número de espécies que o compõem e a escassez de dados

morfológicos disponíveis para auxiliar na delimitação dos grupos (Nepokroff *et al.* 1999; Barrabé, 2012; Taylor, 2016).

O gênero *Palicourea*, por sua vez, é composto por um número que pode variar de 600 (Taylor, 2015) à 800 espécies (Razafimandimbison *et al.* 2014). As principais características do grupo incluem: inflorescências coloridas e chamativas, que podem variar de vermelho à azul e sem odor; corolas tubulares e flores polinizadas por beija-flores; flores pentâmeras, com estivação valvada; estípulas persistentes; frutos drupáceos com coloração azul ou preta e com dois pirênios (Taylor, 1997; Nepokroff *et al.* 1999; Taylor, 2015). A tribo Palicoureeae, como um todo, é considerada um grupo monofilético (Barrabé, 2012), porém tal monofiletismo precisa ser testado com uma amostragem mais robusta para a obtenção de dados concretos (Razafimandimbison *et al.* 2014).

Inicialmente, tais gêneros eram classificados dentro da tribo Psychotrieae. Porém, a associação de análises morfológicas e moleculares em estudos filogenéticos evidenciou que Psychotrieae, em uma circunscrição mais ampla, é formada por dois principais grupos: um contendo o gênero *Psychotria* e outro composto por diversos outros gêneros, incluindo *Palicourea*. Dessa forma, ambos foram separados em tribos distintas (Robbrecht & Manen, 2006; Razafimandimbison *et al.* 2014; Taylor, 2017).

Nos últimos anos, diversos estudos filogenéticos foram realizados tentando compreender as relações sistemáticas entre os membros que compõem a aliança Psychotrieae (Andersson & Rova, 1999; Bremer & Manen, 2000; Robbrecht & Manen, 2006; Razafimandimbison *et al.* 2008; Razafimandimbison *et al.* 2014). No entanto, as relações filogenéticas infratribais em Psychotrieae e Palicoureeae permanecem incertas (Barrabé *et al.* 2012; Razafimandimbison *et al.* 2014;). Esse fato decorre, principalmente, do grande número de espécies que compõem o clado *Psychotria* + *Palicoureeae*, e de amostragens insuficientes para a obtenção de relações bem definidas, além da ausência de caracteres morfológicos óbvios para diagnosticar as principais linhagens (Piesschaert *et al.* 1999; Razafimandimbison *et al.* 2008; Razafimandimbison *et al.* 2014).

As pesquisas que apresentam esse objetivo têm sido mais rigorosas em suas análises. Em *Psychotria*, por exemplo, algumas características morfológicas observadas, como os tipos de frutos de algumas espécies, mostram uma relação mais próximas com

outros gêneros da subfamília Rubioideae. Existe uma dificuldade, em alguns casos, em afirmar se uma espécie de fato pertence a esse gênero ou a Palicoureeae. Dessa forma, a transferência de diversas espécies de *Psychotria* para seus devidos gêneros em outras tribos, como Palicoureeae, tem apresentado um efeito positivo em suas delimitações, reduzindo a variação morfológica de Psychotrieae e tornando um clado melhor suportado por estudos moleculares (Taylor, 1997; Razafimandimbison *et al.* 2014).

Considerando tais dificuldades nas delimitações das relações filogenéticas desse clado, uma metodologia de investigação mais ampla deve ser abordada. Estudos moleculares, utilizando DNA nuclear e plastidial (Andersson & Rova, 1999; Robbrecht & Manen, 2006; Razafimandimbison *et al.* 2014), levaram à (e ainda representam) um enorme avanço em estudos sistemáticos desse grupo. Porém, inúmeros autores ressaltam a importância da associação de análises morfológicas em conjunto com as moleculares, produzindo trabalhos filogenéticos e evolutivos baseados em um conjunto de diferentes áreas (Taylor, 1997; Nepokroff *et al.*, 1999; Endress, 2002; Razafimandimbison *et al.* 2008; Razafimandimbison *et al.* 2014). A inclusão de análises morfoanatômicas, portanto, pode auxiliar no estabelecimento de relações entre os grupos que formam o clado *Psychotria* + Palicoureeae, além de ajudar a compreender aspectos evolutivos do grupo.

## **1.2. Anatomia de órgãos reprodutivos: aplicação em estudos taxonômicos**

O estudo dos caracteres morfoanatômicos apresenta grande importância quando aplicado em um contexto filogenético e evolutivo. A comparação das características morfológicas em um determinado grupo auxilia na compreensão das bases de desenvolvimento para a evolução de um determinado caráter, bem como na sua função ecológica e significância adaptativa (Kaplan, 2001).

Uma das características consideradas mais confiáveis e mais utilizadas para a delimitação de grupos em angiospermas é a morfoanatomia floral (Endress & Matthews, 2012). As características florais mais comumente usadas em análises cladísticas incluem: simetria, organização e número de órgãos dos verticilos, posição do ovário e se os androsporângios e ginosporângios estão presentes ou não na mesma flor (Kaplan, 2001). A análise comparada da ontogênese floral em um clado pode ser utilizada com um suporte para estudos filogenéticos moleculares, além de auxiliar na

elucidação dos mecanismos de desenvolvimento dos órgãos florais e no estabelecimento de homologias e/ou analogias (Buzgo, 2001; Tucker, 2003; Prenner & Rudall, 2007; Basso-Alves, 2017).

Em Rubiaceae, existe uma enorme diversidade relacionada a morfoanatomia floral e em suas características de desenvolvimento. Especificamente sobre os gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, ambos apresentam inflorescências cimosas e terminais, com corolas tubulares, mas algumas diferenças podem ser destacadas. As flores em *Psychotria* apresentam corolas tubulares, mas sem fusão até o ápice, de coloração que varia de esverdeada à branca (sendo a última mais comum), com estivação valvada, geralmente actinomorfas e estames fusionados no tubo da corola (Barrabé, 2014). O gênero *Palicourea*, por sua vez, possui inflorescências que podem ser consideradas a característica marcante do grupo. Este gênero apresenta flores bem separadas e pentâmeras, com corola tubular praticamente até o ápice e estivação valvada. A coloração das flores costuma ser muito chamativa, variando entre azul, roxo, vermelho, laranja e amarelo, devido à polinização realizada por beija-flores (Taylor, 1997).

Essa diversidade floral é resultante de diferenças nos processos ontogenéticos responsáveis pela organização, composição dos órgãos florais e relação dos verticilos entre si, onde os meristemas florais passam por mudanças substanciais e apresentam novas opções na produção e organização de tais órgãos (Douglas, 1997; Claßen-Bockhoff, 2016). Dessa forma, visando uma melhor compreensão das relações naturais entre ambos os gêneros, estudos estruturais sobre os órgãos florais podem auxiliar no estabelecimento de homologias e analogias que são aplicadas em um panorama ecológico e filogenético, tendo grande relevância em um contexto taxonômico (Endress, 1990; Claßen-Bockhoff, 2001; Richter & Wirkner, 2014).

Atualmente, a predominância do uso da biologia molecular na cladística abre novas alternativas para a aplicação de estudos morfoanatômicos. A partir das diversas filogenias bem estabelecidas para Rubiaceae (Robbrecht & Manen, 2006; Razafimandimbison *et al.* 2014), é possível estudar a evolução de determinadas características, produzindo importantes reconstruções de caracteres (Endress, 2002). No entanto, estudos relacionados à anatomia floral de Rubiaceae não são realizados com frequência, e são ainda mais escassos para o clado *Psychotria* + *Palicoureeae*. Em sua maioria, são restritos à determinados órgãos florais, como desenvolvimento do gineceu ou estames, sendo poucos os estudos relacionados à estrutura anatômica dos órgãos

florais que levem em consideração sua significância em um contexto filogenético (Decraene & Smets, 2000; Vaes *et al.* 2006; De Toni & Mariath, 2011).

Juntamente com as análises da morfoanatomia floral, as análises comparativas dos aspectos embriológicos desses grupos podem se mostrar muito úteis e contribuir para o entendimento das relações filogenéticas da aliança Psychotrieae e da família Rubiaceae (De Toni & Mariath, 2008; De Toni & Mariath, 2011). Estudos comparativos e detalhados podem evidenciar a importância das características e processos envolvidos na micro- e megasporogênese e micro- e megagametogênese, permitindo a proposição de tendências evolutivas dentro do grupo (De Toni & Mariath, 2008; Souza *et al.* 2008).

Características dos processos de micro- e megasporogênese e gametogênese, tais como estrutura da placenta, desenvolvimento dos carpelos e do rudimento seminal, epiderme nucelar e tegumentos, tipo de rudimento seminal, estrutura anatômica da antera, morfologia dos grãos de pólen e órbiculos apresentam grande valor taxonômico (Souza *et al.* 2008; De Toni & Mariath, 2008; Figueiredo *et al.* 2013; Romero *et al.* 2017). A análise de tais caracteres pode, também, ajudar a melhor compreender os aspectos reprodutivos de *Palicourea* e *Psychotria*.

No clado Psychotrieae + Palicoureeae, entretanto, o conhecimento relacionado aos processos embriológicos ainda é limitado. Com relação ao desenvolvimento dos micrósporos e gametófitos masculinos, Souza *et al.* (2008) descrevem tais processos em *Psychotria ipecacuanha*. Nesta espécie, a parede da antera é do tipo básico, com quatro camadas (epiderme, endotécio, camada média e tapete). Na microsporogênese, são gerados quatro esporos a partir das meioses reducionais de cada célula mãe de micrósporo, com diferentes conformações (em tétrades, lineares, etc.), envoltos por uma capa de calose. Os micrósporos são arredondados e com uma parede espessada de exina. Na microgametogênese, o núcleo do micrósporo é deslocado à parede, sofrendo mitose e dando origem à uma célula generativa pequena e uma vegetativa maior, e o grão de pólen é liberado com dois núcleos. Ao final da gametogênese, a camada média e o tapete secretor são degenerados, e o endotécio é responsável pela deiscência da antera.

Quanto à megasporogênese e megagametogênese, um dos únicos estudos realizados no clado é o de Figueiredo *et al.* (2013), onde foram avaliados o desenvolvimento de carpelos e rudimentos seminais de *Psychotria carthagenensis* (tribo Psychotrieae) e *Rudgea macrophylla* (tribo Palicoureeae). Em ambas as espécies, os

ovários são bicarpelares, biloculares com um rudimento seminal por lóculo; os rudimentos seminais são tenuinucelados e unitegmentados, apresentando um tegumento externo vestigial; as espécies apresentam até seis células-mãe de megásporo, mas apenas um se torna funcional, com desenvolvimento monospórico do tipo *Polygonum*. Segundo os autores, o padrão do desenvolvimento das duas espécies difere de outros grupos de Rubiaceae, representando uma possível sinapomorfia do clado Psychotriaceae + Palicoureae, e propõem o rudimento do tipo *Psychotria*. Assim, é evidente a necessidade de estudos embriológicos no grupo para verificar se outras espécies do clado apresentam o mesmo tipo de rudimento seminal descrito por Figueiredo *et al* (2013), além de buscar por sinapomorfias que possuam valor taxonômico.

Além da caracterização da anatomia do desenvolvimento floral e dos aspectos embriológicos, a morfoanatomia de frutos e sementes apresenta grande valor para estudos sistemáticos, especialmente na família Rubiaceae (De Toni & Mariath, 2011). Para a família, os frutos podem ser classificados como secos ou carnosos, onde o provável ancestral era o fruto do tipo cápsula, com muitas sementes, e depois houveram diversos surgimentos independentes de frutos carnosos (Bremer e Eriksson, 1992). Ao longo da evolução, o número de sementes por carpelo foi reduzido a uma, condição considerada fixada, e houve a perda dos mecanismos de deiscência, uma característica derivada das capsulas para os frutos carnosos (Bremer e Eriksson, 1992).

Os gêneros *Psychotria* e *Palicourea* apresentam características semelhantes com relação aos seus tipos de frutos. Em ambos, os ovários são ínferos, bicarpelares, biloculares, com a presença de um rudimento seminal por carpelo, característica também compartilhada por grande parte das espécies da subfamília Rubioideae (Robbrecht, 1988; Razafimandimbison *et al.* 2008). Os frutos são considerados drupáceos, geralmente carnosos, com cálice persistente no fruto e endocarpo esclerificado no pirênio, com coloração normalmente esverdeada em *Psychotria* e variada de azul à preto em *Palicourea* (Taylor, 1997; Barrabé, 2012). Esse tipo de fruto apresenta grande importância ecológica em uma ampla variedade de ecossistemas, servindo como alimento principalmente para aves e pequenos mamíferos. (Razafimandimbison *et al.* 2008). As sementes são envoltas por pirênios esclerificados e são unitegmentadas.

Apesar da grande importância ecológica dos frutos de *Psychotria* e *Palicourea*, dados relacionados ao seu desenvolvimento anatômico são escassos. As características anatômicas dos frutos podem prover informações altamente relevantes para classificações dos grupos dentro da família Rubiaceae (De Toni & Mariath, 2011) e da aliança Psychotrieae, e podem auxiliar na compreensão da evolução dos frutos na família (Bremer & Eriksson, 1992; Puff, 2001; Razafimandimbison *et al.* 2008; Figueiredo *et al.* 2013).

Levando em conta a relevância das características do desenvolvimento anatômico de flores, frutos, sementes e dos aspectos embriológicos para a sistemática da aliança Psychotrieae, consideramos que os dados são escassos na literatura. Dessa forma, pretendemos analisar tais processos em diferentes espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, para responder as seguintes questões: (1) A caracterização da estrutura anatômica dos órgãos florais permite determinar variações para os estados de caráter e, quando comparadas as espécies, tais variações podem ser aplicadas em um panorama filogenético? (2) Quais são os mecanismos envolvidos no desenvolvimento anatômico de frutos e sementes que levam às diferenças morfológicas observadas em ambos os gêneros e qual a sua relevância para a sistemática da aliança? (3) As características embriológicas observadas nas espécies dos dois gêneros possuem valor taxonômico e podem fornecer subsídios para estudos filogenéticos da aliança? (4) O tipo rudimento seminal formado ao final dos processos de megasporogênese e megagametogênese corresponde ao tipo *Psychotria*, anteriormente descrito para o clado Psychotrieae + Palicoureeae?

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Analisar e comparar o desenvolvimento anatômico dos órgãos reprodutivos e os processos embriológicos em seis espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar de forma comparativa a estrutura anatômica dos órgãos florais em seis espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, verificando as diferenças estruturais e as relacionando aos dados disponíveis na literatura para a aliança Psychotrieae, visando contribuir para a resolução da sistemática do grupo;
- Descrever e comparar os processos de micro- e megasporogênese e micro- e megagametogênese em seis espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, buscando melhor compreender a biologia reprodutiva do grupo e contribuir para futuros estudos sob uma perspectiva filogenética da aliança Psychotrieae.
- Verificar as diferenças no desenvolvimento anatômico de frutos e sementes em diferentes espécies dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*, desde a estrutura do ovário até a formação do fruto maduro e da semente;

Cada um dos objetivos expostos será abordado em um capítulo diferente da tese.

## 3. HIPÓTESE

Serão identificadas sinapomorfias na estrutura anatômica dos órgãos florais, de frutos e sementes em desenvolvimento e nos processos embriológicos de representantes de *Psychotria* L. e *Palicourea* Aubl., que apresentarão valor taxonômico e poderão ser usados como subsídios para estudos taxonômicos no clado Psychotrieae + Palicoureeae e na resolução sistemática da Aliança Psychotrieae.

## 4. JUSTIFICATIVA

Os estudos filogenéticos realizados para a família Rubiaceae, que incluem os membros da aliança Psychotrieae, apontam para inconsistências nas delimitações internas das tribos, como a parafilía de *Psychotria* e a falta de dados robustos para

confirmar a monofilia e Palicoureeae. Diversos autores relatam, portanto, a importância de uma abordagem ampla, incluindo estudos filogenéticos moleculares em conjunto com análises morfoanatômicas, para um melhor estabelecimento das relações naturais dos grupos. Dessa forma, pretendemos avaliar dados anatômicos a respeito do desenvolvimento de órgãos reprodutivos e de caráter embriológico em seis espécies da aliança Psychotrieae (três do gênero *Psychotria* e três de *Palicourea*). A utilização de tais dados, em conjunto com as filogenias moleculares disponíveis na literatura, pode ajudar a esclarecer relações entre os grupos que compõem a aliança Psychotrieae, além de contribuir para o entendimento da evolução de características reprodutivas nos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Material Vegetal

Serão coletados botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento, flores em antese, frutos e sementes de seis espécies pertencentes ao clado Psychotrieae + Palicoureeae: *Psychotria carthagenensis* Jacq.; *Psychotria brachyceras* Müll. Arg.; *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schldl.; *Palicourea rigida* Kunth.; *Palicourea marcgravii* A. St. Hill. e *Palicourea macrobotrys* (Ruiz & Pav.) Schult.. Para cada espécie, os materiais referidos serão coletados de, pelo menos, três indivíduos diferentes, com o auxílio de pinças e lâminas de aço. Exemplares dos materiais botânicos coletados serão depositados no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

### 5.2 Análises anatômicas

Os materiais destinados para análises sob microscopia de luz serão fixados, no momento da coleta, em solução de Glutaraldeído 1% e Formaldeído 4% (McDowell & Trump, 1976). Em laboratório, serão desidratados em série etílica e infiltrados em resina hidroxietilmetacrilato (Gerrits & Smid, 1983). Os materiais serão seccionados em micrótomo rotativo com a espessura de 5-8  $\mu\text{m}$  e corados com Azul de Toluidina O 0,1% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 4,4 (Feder & O'Brien, 1968). As lâminas serão montadas com resina sintética Entellan® (Merck). A documentação será realizada

utilizando o microscópio Leica DMR HC com sistema de captura digital Zeiss AxioCam, utilizando o software livre de captura de imagens Carl Zeiss Zen Lite 2012.

### **5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Para a análise de superfície dos materiais, as amostras serão desidratadas em série etílica e secas pelo método do ponto crítico com CO<sub>2</sub> no equipamento Balzers modelo CPD 030. Em seguida, o material será montado em suportes metálicos e recoberto com ouro coloidal por 180 segundos no equipamento Bal-Tec modelo SCD 050. A análise e o registro eletromicrográfico serão realizados no microscópio eletrônico de varredura JEOL 6060 no Centro de Microscopia e Microanálise – CMM da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

## **6. EQUIPE**

- Doutorando: Rhaniel Nicholas Lisowski Gonçalves
- Orientador: Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araújo Mariath

## **7. RESULTADOS ESPERADOS**

A partir das análises anatômicas, pretendemos observar diferenças nos processos de formação dos micrósporos, megásporos e gametas, na estrutura anatômica dos órgãos florais e nos mecanismos de desenvolvimento de frutos e sementes entre as espécies estudadas. Com isso, iremos comparar as diferenças entre as espécies e aplica-las em um panorama filogenético, fornecendo subsídios para futuros estudos taxonômicos relacionados ao clado Psychotriaceae + Palicoureae, à aliança Psychotriaceae e para a família Rubiaceae. Ainda, esperamos observar e determinar padrões de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, fornecendo dados que permitam compreender os aspectos reprodutivos dos gêneros *Psychotria* e *Palicourea*.

## 8. ATIVIDADES E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	Semestres (4 anos)								
	01/19	02/19	01/20	02/20	01/21	02/21	01/22	02/22	01/23
<b>Levantamento Bibliográfico</b>	X	X	X	X	X	X	X	X	
<b>Disciplinas no PPGBot</b>	X	X	X	X	X	X			
<b>Coleta e fixação do material</b>	X	X	X	X	X	X	X		
<b>Preparação de lâminas permanentes para Microscopia de Luz</b>	X	X	X	X	X	X	X		
<b>Microscopia Eletrônica de Varredura de sementes e órgãos florais</b>			X	X	X	X	X		
<b>Análise dos resultados e elaboração da tese</b>		X	X	X	X	X	X	X	
<b>Preparação de artigos para publicação</b>			X	X	X	X	X	X	
<b>Exame de qualificação</b>					X				
<b>Participação em eventos científicos</b>				X		X		X	
<b>Defesa de tese</b>									X

## 9. INFRAESTRUTURA E RECURSOS DISPONÍVEIS PARA CUSTEIO DAS ATIVIDADES PREVISTAS

O Laboratório de Anatomia Vegetal (LAVeg) e o Centro de Microscopia e Microanálises (CMM), ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), contam com toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento da tese. Os recursos necessários serão obtidos via auxílio PROAP/CAPES e existentes no LAVeg (projetos anteriormente aprovados).

## 10. PREVISÃO DE PUBLICAÇÕES

Serão submetidos para publicação três artigos provenientes da tese, referentes à cada capítulo. Os artigos sobre o desenvolvimento de frutos e sementes e sobre os processos embriológicos serão submetidos ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society* (A2). O artigo sobre anatomia floral será submetido ao periódico *Flora* (B1).

## 11. ORÇAMENTO

O valor total (quadro 1 + quadro 2) previsto para realização da Tese de Doutorado é de R\$ 14.744,45 (quatorze mil, setecentos e quarenta e quatro reais e quarenta e cinco centavos).

**Quadro 1** - Orçamento de material de consumo

Item	Quantidade	Custo Unit. (R\$)	Custo Total (R\$)
Glutaraldeído 25%	5 frascos (1L)	55,90	279,50
Formaldeído 10%	25 frascos (2L)	11,31	282,75
Fosfato de sódio monobásico	1 frasco (1Kg)	50,00	50,00
Fosfato de sódio bibásico	1 frasco (1Kg)	60,00	60,00
Etanol Absoluto	10 frascos (1L)	8,14	81,40
Etanol Comercial	10 frascos (1L)	9,18	91,80
Pinça ponta fina	4 peças	12,00	48,00
Luvas cirúrgicas M	1 caixa	16,00	16,00
Papel A4 (impressão)	5 pacotes	14,00	70,00
Cartuchos tinta preta	1 peça	150,00	150,00
Cartuchos tinta colorida	1 peça	300,00	300,00
Lâminas de barbear	10 caixas	2,00	20,00
Clorofórmio	2 frascos (1L)	25,00	50,00
Acetona	1 frasco (1L)	30,00	30,00
Dimetoxipropano	4 frascos (1L)	125,00	500,00
Vidro de coleta, lacre e tampa	200 (Cj)	0,50	100,00
Tetróxido de ósmio	1 ampola	2.000,00	2.000,00
Porta amostras - "Stub"	250 unidades	2,50	625,00
Caixa para armazenagem de porta amostras - "stub"	1 unidade	200,00	200,00

Saco plástico com fecho	3 pacotes (100un)	30,00	90,00
Sub-Total	--	--	5.044,45

## Serviços

**Quadro 2** - Orçamento de utilização de serviços

Item	Custo Total (R\$)
Utilização e Serviços do CMM - Centro de Microscopia e Microanálise UFRGS (20 horas)	1.600,00
Encadernação (8 cópias)	100,00
Saída de Campo*	5.000,00
Participação em Eventos **	3.000,00
Sub-Total	9.700,00

\*Calculada para 02 pessoas, por período de 07 dias.

\*\* Calculado para 01 pessoa participar em até 3 eventos Nacionais.

## 12. PREVISÃO DE FONTE DE RECURSOS

A previsão de fonte de recursos é a obtenção de bolsa de estudos concedidas pelas agências de fomento CAPES ou CNPq e projeto de pesquisa para obter verbas de custeio para realização do trabalho, a ser encaminhado pelo orientador para agências de fomento, além de recursos pré-existent oriundos de projetos anteriormente executados e de responsabilidade do orientador.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRABÉ, L.; BUERKI, S.; MOULY, A.; DAVIS, A. P.; MUNZINGER, J.; MAGGIA, L. Delimitation of the genus *Margaritopsis* (Rubiaceae) in the Asian, Australasian and Pacific region, based on molecular phylogenetic inference and morphology. **Taxon**. v. 61, n. 6, p. 1251-1268. 2012.
- BARRABÉ, L. Four new species of *Psychotria* (Rubiaceae) from New Caledonia, including one presumed to be extinct. **Phytotaxa**. v. 173, n. 2, p. 101-116. 2014.
- BASSO-ALVES, J. P.; GOLDENBERG, R.; TEIXEIRA, S. P. The ontogenetic bases for variation in ovary position in Melastomataceae. **American Journal of Botany**. v. 104, n. 1, p. 1142-1156. 2017.
- BREMER, B.; ERIKSSON, O. Evolution of fruit characters and dispersal modes in the tropical family Rubiaceae. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 47, p. 79-95. 1992.
- BUZGO, M. Flower structure and development of Araceae compared with alismatids and Acoraceae. **Botanical Journal of Linnean Society**. v. 136, n. 1, p. 393-245. 2001.
- CLAßEN-BOCKHOFF, R. Plant morphology: the historic concepts of Wilhelm Troll, Walter Zimmermann and Agnes Arber. **Annals of Botany**. v. 88, n. 1, p. 1153-1172. 2001.
- CLAßEN-BOCKHOFF, R. The shoot concept of the flower: Still up to date?. **Flora**. v. 221, n. 1, p. 46-53. 2016.
- DECRAENE, L. P. R.; SMETS, E. F. Floral development of *Galopina tomentosa* with a discussion of sympetaly and placentation in the Rubiaceae. **Syst. Geogr. Pl.** v. 70, n. 1, p. 155-170. 2000.
- DE TONI, K. G. L.; MARIATH, J. E. A. Desenvolvimento do rudimento seminal em *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Rubiaceae – Rubioideae – Spermacoceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 27, n. 1, p. 185-192. 2004.
- DE TONI, K. L. G.; MARIATH, J. E. A. Ovule ontogeny in Rubiaceae (Juss.): *Chomelia obtusa* (Cinchonoideae–Guettardeae) and *Ixora coccínea* (Ixoroideae–Ixoreae). **Plant Systematics and Evolution**. v. 272, n. 1, p. 39-48. 2008.
- DE TONI, K. L. G. MARIATH, J. E. A. Developmental Anatomy and Morphology of the Flowers and Fruits of Species from *Galium* and *Relbunium* (Rubiaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 98, n. 2, p. 206-225. 2011.

- DOUGLAS, A. W. The developmental basis of morphological diversification and synorganization in flowers of conospermeae (*Stirlingia* and *conosperminae*: Proteaceae). **International Journal of Plant Sciences**. v. 158, n. 6, p. 13-48. 1997.
- ENDRESS, P. K. Morphology and Angiosperm Systematics in the Molecular Era. **The Botanical Review**. v. 68, n. 4, p. 545-570. 2002.
- ENDRESS, P. K.; MATTHEWS, M. L. Progress and problems in the assessment of flower morphology in higher-level systematics. **Plant Systematics and Evolution**. V. 298, n. 1, p. 257-276. 2012.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. v. .55, n. 1, p. 123-142. 1968.
- FIGUEIREDO, R. C.; MASULLO, F. A.; VIEIRA, R. C.; DE TONI, K. G. L. Development of carpels and ovules in *Psychotria carthagenensis* (Psychotrieae) and *Rudgea macrophylla* (Palicoureeae) (Rubioidae, Rubiaceae). **South African Journal of Botany**. v. 84, n. 1, p. 110-114. 2013.
- GERRITS, P. O.; SMID, L. A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial section. **Journal of Microscopy**. v.132, n. 1, p. 81-85. 1983.
- KAPLAN, D. R.; The Science of Plant Morphology: Definition, History, and Role in Modern Biology. **American Journal of Botany**. v. 88, n. 10, p. 1711-1741. 2001.
- MCDOWELL, E. M.; TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v. 100, n. 1, p. 405-414. 1976.
- NEPOKROEFF, M. BREMER, B.; SYTSMA, K. J. Reorganization of the Genus *Psychotria* and Tribe Psychotrieae (Rubiaceae) Inferred from ITS and *rbcL* Sequence Data. **Systematic Botany**. v. 24, n. 1, p. 5-27. 1999.
- PIESSCHAERT, F. ROBBRECHT, E.; POULSEN, A. D.; SMETS, E. Pyrene and pollen observations in the pantropical genus *Geophila* (Rubiaceae-Psychotrieae). **Nordic Journal of Botany**. v. 19, n. 1, p. 93-100. 1999.
- PRENNER, G.; RUDALL, P. J. Comparative ontogeny of the cyathium in euphorbia (euphorbiaceae) and its allies: exploring the organ-flower-inflorescence boundary. **American Journal of Botany**. v. 94, n. 10, p. 1612-1629. 2007.
- PUFF, C. The significance of gynoeceum and fruit and seed characters or the classification on the Rubiaceae. **Malayan Nature Journal**. v.55, n.1-2, p.133-146, 2001.
- RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; RYDIN, C.; BREMER, B. Evolution and trends in the Psychotrieae alliance (Rubiaceae) - A rarely reported evolutionary change of many-seeded carpels from one-seeded carpels. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 48: p. 207-223. 2008.

- RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; TAYLOR, C. M.; WIKSTROM, N. PAILLER, T.; KHODABANDEH, A.; BREMER, B. Phylogeny and generic limits in the sister tribes Psychotrieae and Palicoureeae (Rubiaceae): evolution of schizocarps in Psychotria and origins of bacterial leaf nodules of the malagasy species. **American Journal of Botany**. n. 101, n. 7, p. 1102-1126. 2014.
- RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; KAINULAINEN, K.; WIKSTRÖM, N.; BREMER, B. Historical biogeography and phylogeny of the pantropical Psychotrieae alliance (Rubiaceae), with particular emphasis on the Western Indian Ocean Region. **American Journal of Botany**. v. 104, n. 9, p. 1407-1423. 2017.
- RICHTER, S.; WIRKNER, S. A research program for Evolutionary Morphology. **J Zoolog Syst Evol Res**. v. 52, n. 1, p. 338-350. 2014.
- ROBBRECHT, E. Tropical Woody Rubiaceae. Characteristic Features and Progressions. **Opera Botanica Belgica**. 1988.
- ROBBRECHT, E.; MANEN, J. F. The Major Evolutionary Lineages of the Coffee Family (Rubiaceae, Angiosperms). Combined Analysis (nDNA and cpDNA) to Infer the Position of Coptosapelta and Luculia, and Supertree Construction Based on rbcL, rps16, trnL-trnF and atpB-rbcL Data. A New Classification in Two Subfamilies, Cinchonoideae and Rubioideae. **Systematics and Geography of Plants**. v. 76, n. 1, p. 85-145. 2006.
- ROMERO, M. F.; SALAS, R.; GONZALEZ, A. M. Pollen development and orbicule and pollen grain morphology in species of Cephalanthus (Rubiaceae-Naucleaeae) from the Americas. **Australian Journal of Botany**. v. 65, n. 1, p. 233-247. 2017.
- SOUZA, M. M.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, T. N. S.; OLIVEIRA, L. O. Reproductive Studies in Ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stockes; Rubiaceae): Pollen Development and Morphology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 5, p. 981-989. 2008.
- TAYLOR, C. M. Conspectus of the Genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the Description of Some New Species from Ecuador and Colombia. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. v. 84, n. 2, p. 224-262. 1997.
- TAYLOR, C. M.; Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XXX: More New Species of *Palicourea* (Palicoureeae) from Western South America. **Novon**. v. 24, n. 3, p. 296-318. 2015.
- TAYLOR, C. M.; HOLLOWELL, V. C. Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XXXV: The New Group *Palicourea* sect. *Nonatelia*, with Five New Species (Palicoureeae). **Novon**. v. 25, n. 1, p. 69-110. 2016.
- TAYLOR, C. M. Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars XXXVII: The New Group *Palicourea* sect. *Chocoanae* of the Chocó Biogeographic Region, with Two New Species (Palicoureeae). **Novon**. v. 25, n. 3, p. 322-342. 2017.

- TUCKER, S. C. Floral Development in Legumes. **Plant Physiology**. v. 131, n. 1, p. 911-926. 2003.
- VAES, E.; VRIJDAGHS, A.; SMETS, E. F.; DESSEIN, S. Elaborate Petals in Australian Spermatoce (Rubiaceae) Species: Morphology, Ontogeny and Function. **Annals of Botany**. v. 98, n. 1, p. 1167-1178. 2006.