

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Dilana Ferreira da Silva

O gênero *Dalechampia* L. (Euphorbiaceae – Acalyphoideae) na  
região Sul do Brasil

Projeto a ser apresentado para avaliação pelo  
PPG Botânica da UFRGS

**Orientadora:** Professora Dra. Mara Rejane Ritter  
**Co-orientadora:** Professora Dra. Inês Cordeiro

**Porto Alegre**  
**2016**

**Resumo:** O gênero *Dalechampia* L. pertence à família Euphorbiaceae s.s. e apresenta ampla distribuição Neotropical, sendo o Brasil um dos centros de diversidade, com 72 espécies. Trabalhos de anatomia, morfologia, fitossociologia e polinização são os mais ocorrentes com o gênero, sendo poucos os trabalhos taxonômicos desenvolvidos na região Sul do Brasil. A única pesquisa encontrada traz indagações e sugestões de novas reorganizações de táxons, sinonimizações e subordinações de seções, além de enfatizar a necessidade de um trabalho mais detalhado e abrangente com o gênero. O presente trabalho tem por objetivos realizar um estudo taxonômico do gênero *Dalechampia* na região Sul do Brasil levantar dados florísticos, ecológicos e taxonômicos das espécies citadas, averiguar se houve restrição ou ampliação, esclarecer problemas de identificação e nomenclaturais, fornecer informações quanto à floração e frutificação e, ainda, fornecer chaves dicotômicas e ilustrações. Os principais herbários do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná serão revisados. As saídas de campo se estenderão por todas as regiões fisiográficas da região Sul do Brasil.

## INTRODUÇÃO

### 1. A família Euphorbiaceae Jussieu

Euphorbiaceae é considerada uma das mais complexas e diversas famílias da ordem Malpighiales, com diferentes formas de hábito - lianas, trepadeiras, ervas, arbustos e árvores, as quais apresentam inúmeras variações morfológicas (Judd *et al.* 2009). Apresenta distribuição pantropical, incluindo aproximadamente 300 gêneros e 6000 espécies (APG III 2012). No Brasil, são citados 63 gêneros e 939 espécies (Flora do Brasil 2020 em construção).

A primeira observação e classificação da família Euphorbiaceae foi realizada por Carolus Linneu, em meados do século XVIII, que a nomeou como família Tricoccae constituída por poucos gêneros (Bruyset 1787 *apud* Gagliardi 2014). Em 1789 a família Euphorbiaceae foi originalmente descrita pelo pesquisador e naturalista francês Antonii Laurentii De Jussieu que dividiu a família em 33 gêneros, estes, separados em dois grupos, um com flores de estilete único e outro com flores com três estiletos (Jussieu 1789).

Com o passar do tempo houveram muitas modificações na classificação da família, sendo o primeiro deles o sistema Baillon, proposto pelo francês Henri Ernest Baillon (1858), que classificava os táxons em séries. Alguns anos depois, Jean Müller Argoviensis (1866), propôs o sistema mülleriano uma classificação mais detalhada quanto a subfamílias, tribos e subtribos, sendo seguida por diversos autores. Posteriormente, inúmeros pesquisadores se dedicaram ao estudo da família, com o propósito de conhecê-la e classificá-la, dentre eles, Pax & Hoffmann (1914, 1931), Jablonski (1967), Hutchinson (1969), e mais recentemente Webster (1975, 1989, 1994a, 1994b), que propôs uma nova classificação para a família, incluindo cinco subfamílias (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonioideae e Euphorbioideae), sete tribos e 10 subtribos (Webster 1975). Essa nova classificação de Webster (1975) refletia nos conhecimentos filogenéticos e na morfologia polínica (Punt, 1962; Köler, 1965) que lhe pareciam mais viáveis que os sistemas de classificação antecessores.

Pesquisas referentes às análises moleculares e filogenéticas (Chase *et al.* 2002; Davis e Chase 2004) reorganizaram os táxons em Euphorbiaceae *s.s.*, Phyllanthaceae, Picrodendraceae e Putranjivaceae (Judd *et al.* 2009) e além disso, não suportaram sua monofilia (Chase *et al.* 2002; Davis & Chase 2004).

Após estudos filogenéticos com a família Euphorbiaceae *s.s.* se teve o conhecimento da sua monofilia (Wurdack, Hoffmann & Chase 2005). Atualmente, Euphorbiaceae *s.s.* é composta por quatro subfamílias (Cheilosoideae, Acalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae), 218 gêneros e 6.745 espécies amplamente distribuídas pelos trópicos e subtropicais do mundo (Stevens 2001, em continuidade). Acalyphoideae foi reconhecida como subfamília por Ascherson (1864), atualmente, compreende 99 gêneros e 1.865 espécies (Stevens 2001 em continuidade) e segundo Webster (1994a) é a mais abundante e complexa subfamília de Euphorbiaceae, apresentando 20 tribos, incluindo arbóreas, arbustos e herbáceas (Webster 1994b). Recentemente, Cardinal-McTeague & Gillespie (2016) reconheceram a partir de análises filogenéticas a monofilia da subtribo Dalechampiinae, a qual o gênero *Dalechampia* pertence, embora o número amostrado se restringisse a quatro espécies com ocorrência em Madagascar.

#### 1.1 O gênero *Dalechampia* L.

O gênero *Dalechampia* L. foi descrito por Linnaeus na obra *Genera Plantarum* (1754), homenageando o médico e botânico francês Jacques Dalechamp (Smith, Downs &

Klein 1988). *Dalechampia* L. pertence à família Euphorbiaceae, à subfamília Acalyphoideae, à tribo Plukenetieae (Bentham 1880) e à subtribo Dalechampiinae (Webster 1994b).

Pax & Hoffmann (1919) elaboraram uma sinopse que foi considerada uma referência para o gênero. Nesse trabalho, foram descritas as características de 13 seções e de cada espécie. Webster (1989), que se destacou pelos vários trabalhos com o gênero, questionou o método utilizado por esses autores, que se basearam em poucas coleções de herbários. Entre as suas averiguações se destaca a mudança da tribo Dalechampieae, a qual foi incluída na tribo Plukenetieae, tornando-se assim subtribo Dalechampiinae (Webster 1994b). A justificativa para essa mudança foi a presença de tricomas urticantes e a coluna do estigma alongada, características de Tragiinae e Plukenetiinae, respectivamente (Webster 1994b). Três novas espécies de *Dalechampia* foram descritas para o Brasil – Bahia, Ceará e Espírito Santo, por Webster (1989) contribuindo para o conhecimento do grupo.

Nenhuma pesquisa com o gênero, para o Rio Grande do Sul, foi tão específica quanto o trabalho de Allem & Waechter (1977), que propuseram a sinonimização de muitas espécies já citadas para o estado. Verificaram um amplo polimorfismo nos espécimes da região e levantaram dúvidas quanto a alguns caracteres utilizados para a separação desses táxons. Mais tarde, Webster & Armbruster (1991) publicaram uma sinopse para as espécies de *Dalechampia* ocorrentes nos Neotrópicos, citando seis seções e 94 espécies. Dados sobre pseudanto, indumento, folhas, sementes, frutos, habitats e dados ecológicos foram disponibilizados por Webster & Armbruster (1991). Afirmaram ainda a necessidade de se conhecer melhor o táxon, realizando mais coletas e revisões de herbários e à sinonimização de algumas espécies citadas por Allem & Waechter (1977).

O gênero está distribuído nos trópicos do Velho e Novo Mundo (Webster 1989) e inclui, até o momento, 121 espécies (IUCN 2016). Ocorre, principalmente, na América do Sul e, segundo a Flora do Brasil 2020 (em construção) e Tropicos (2016) para o Brasil foram constatadas 72 espécies distribuídas em quase todos os estados e para a região Sul foram citadas 16 espécies (Tabela 1).

**Tabela 1:** Espécies de *Dalechampia* L. citadas para os Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Flora do Brasil 2020 em construção; Trópicos 2016).

<b>Espécies</b>	<b>Ocorrência na região</b>	<b>Sinônimos</b>
<i>Dalechampia anomala</i> Pax & K. Hoffm.	Sul PR	-
<i>Dalechampia bangii</i> Pax & K. Hoffm.	RS	<i>Dalechampia boliviana</i> Gandoger.
<i>Dalechampia clauseniana</i> Baill.	PR, SC	<i>Dalechampia triphylla</i> var. <i>clauseniana</i> Müll. Arg. <i>Dalechampia triphylla</i> var. <i>villosa</i> (forma Müll. Arg. <i>Dalechampia triphylla</i> var. <i>villosa</i> (forma Müll. Arg.

<i>Dalechampia ficifolia</i> Lam.	PR, SC	<i>Dalechampia tiliifolia</i> var. <i>ficifolia</i> (Lam.)
<i>Dalechampia glechomifolia</i> Baill.	PR, RS	<i>Dalechampia microphylla</i> Müll. Arg.
<i>Dalechampia hassleriana</i> Chodat	PR	-
<i>Dalechampia leandrii</i> Baill.	PR	<i>Dalechampia vulpina</i> Müll. Arg.
<i>Dalechampia meridionalis</i> Müll. Arg.	PR	<i>Dalechampia pallida</i> Klotzsch ex Pax & K.
<i>Dalechampia micromeria</i> Baill.	PR, SC, RS	<i>Dalechampia micromeria</i> var. <i>angustifolia</i> Hoffm.
	PR	<i>Dalechampia sellowiana</i> var. <i>serrata</i> Müll.
<i>Dalechampia pentaphylla</i> Lam.	PR, SC	-
<i>Dalechampia reitzkleinii</i> L.B. Sm.& Downs	SC	-
<i>Dalechampia riparia</i> L.B. Sm.& Downs	RS	-
<i>Dalechampia stenosepala</i> Müll. Arg.	PR, SC, RS	<i>Dalechampia patagonica</i> Pax & K. Hoffm.
<i>Dalechampia stipulacea</i> Müll. Arg.		<a href="#"><u><i>Dalechampia stipulacea</i> fo. <i>minor</i> Müll. A</u></a>
		<i>Dalechampia stipulacea</i> var. <i>bogotensis</i> Hoffm.
		<a href="#"><u><i>Dalechampia stipulacea</i> var. <i>membrana</i> Arg.</u></a>
		<a href="#"><u><i>Dalechampia stipulacea</i> var. <i>minor</i> Müll. A</u></a>
		<i>Dalechampia stipulacea</i> var. <i>piauhiensis</i> M.
<i>Dalechampia ulmifolia</i> Chodat & Hassl.	RS	<a href="#"><u><i>Dalechampia grueningiana</i> Pax</u></a>
		<a href="#"><u><i>Dalechampia ulmifolia</i> var. <i>grueningiana</i> (</u></a>
<i>Dalechampia weddelliana</i> Baill.	PR	<a href="#"><u><i>Dalechampia amambayensis</i> Pax &amp; K. Ho</u></a>
		<a href="#"><u><i>Dalechampia morifolia</i> Pax &amp; K. Hoffm.</u></a>
		<a href="#"><u><i>Dalechampia trichophila</i> Pax &amp; K. Hoffm.</u></a>

Há abrangência de *Dalechampia* nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica, da Amazônia, do Cerrado, da Caatinga e em menor proporção no Pantanal e no Pampa (Flora do Brasil 2020, em construção). A principal forma de vida do gênero são vinhas (trepadeiras), porém, algumas podem ser ervas ou subarbustos (Webster & Armbruster 1991). São encontradas principalmente em borda de florestas tropicais, principalmente em suas margens (Webster 1994a) e ainda, em formações campestres e nas encostas de morros (Allem & Waechter 1977). O período de floração e frutificação na maioria das espécies se dá de forma contínua, ocorrendo um intervalo nos meses de junho, julho e agosto (dados obtidos a partir das exsicatas revisadas em vários herbários).

O gênero é monóico díclino e há uma grande variação na morfologia das folhas que podem ser unilobadas, palmada-lobada ou palmada-partida. A presença de estípulas é uma característica fundamental na diferenciação de certas espécies (Webster & Armbruster

1991). A maioria das espécies tem dois diferentes tipos de tricomas, os simples e os urticantes e, encontram-se ainda glândulas resiníferas próximas as flores estaminadas. Essas glândulas de resina são conhecidas como recompensa aos polinizadores, que na sua maioria são abelhas indígenas (Armbruster 1993). As três flores pistiladas são monoclamídeas e estão dispostas em cimeiras na posição basal e as flores estaminadas monoclamídeas estão dispostas em pleiocásios que apresentam bractéolas resiníferas próximas às flores. As flores pistiladas e estaminadas são circundadas por duas brácteas involucrais que formam o pseudanto estrutura que apresenta uma gama diversidade de formas, colorações e tamanhos (Webster & Armbruster 1991) e que envolve estudos de sua história evolutiva e dos seus agentes polinizadores.

## 1.2 Citogenética de *Dalechampia*

Estudos citotaxonômicos, em sua maioria, são desenvolvidos em espécies de regiões temperadas, principalmente da flora norte-americana e europeia (Guerra 1990). Entretanto, se reconheceu a possibilidade de ocorrer diferentes mecanismos evolutivos cariológicos nas espécies de áreas temperadas e tropicais (Stebbins 1966; Ehrendorfer 1970), existindo assim, a necessidade de mais estudos citogenéticos nestas regiões, buscando compreender suas definições evolutivas e taxonômicas (Guerra 1990).

Perry (1943) após realizar inúmeras análises citogenéticas com representantes da família constatou que 50% das espécies são poliploides, sendo a disploidia observada em plantas anuais e a poliploidia em espécies perenes.

A partir da análise de contagem de cromossomos mitóticos e/ou meióticos é possível determinar e comparar dados cromossômicos (número, morfologia e simetria) de um grande número de espécies de uma determinado táxon e se obter informações substanciais a respeito da evolução dos genomas das espécies (Guerra 1990). Tais metodologias, na maioria das vezes, são de fácil execução e custos não elevados. Lombello & Forni-Martins (1998), analisando trepadeiras de sete diferentes famílias, asseguram a importância de se conhecer a cariomorfologia e o número cromossômico, pois estes auxiliam nas pesquisas taxonômicas e os padrões evolutivos desses grupos. A citotaxonomia tem permitido a diferenciação de inúmeras espécies mediante análises de número cromossômico, arquitetura cariotípica, comportamento meiótico e viabilidade polínica (Souza-Chies *et al.* 2014).

Os primeiros trabalhos citogenéticos realizados com o gênero tiveram a autoria de Mangenot & Mangenot (1962) com *Dalechampia ipomoeifolia*,  $2n = 44$  e Miede (1962) com *D. scandens*,  $2n = 72$ . Após, Vanzela *et al.* (1997) realizaram o estudo cariotípico de oito espécies de *Dalechampia* citadas para o Brasil, sendo elas *D. clausseniana*, *D. ficifolia*, *D. hassleriana*, *D. leandrii*, *D. meridionalis*, *D. pentaphylla* *D. stenosepala* e *D. stipulacea*. Posteriormente, Lombello & Forni-Martins (1998) confirmaram os dados de Vanzela *et al.* (1997) *Dalechampia pentaphylla* de  $2n = 36$ . Vanzela *et al.* (1997) sugerem que o número básico para o gênero seja  $x = 6$ , entretanto, considerando que apenas 10% do gênero foi analisado, é preciso investigar um número maior de espécies a fim de confirmar esse número. *Acalypha*, gênero ancestral de *Dalechampia* apresenta número básico  $x = 6$ , o que apoia a proposta de Vanzela *et al.* (1997). Para a subfamília Acalyphoideae, ainda não se conhece um número base correto.

## JUSTIFICATIVA

Apesar da ampla representatividade de espécies no Brasil, 72 espécies (Flora do Brasil 2020 em construção), o gênero ainda é pouco estudado. A maioria dos trabalhos são referentes à polinização, florística, morfologia e anatomia, sendo que os estudos taxonômicos sofrem com a carência de chaves de identificação e informações atualizadas de distribuição, vegetação e domínios geográficos. Se tem conhecimento de apenas uma

sinopse taxonômica para o gênero, para a região Neotropical, a qual foi desenvolvida por Webster & Armbruster (1991). Embora a obra citada seja de grande relevância para a compreensão geral do gênero, a mesma encontram-se desatualizada no que concerne ao número e a distribuição geográfica de algumas espécies.

Em virtude do alto polimorfismo e da ampla distribuição dos espécimes, dúvidas quanto à sinonimização de algumas espécies (e.g. *Dalechampia ulmifolia*, *D. micromeria*, *D. stipulacea*, *D. glechomifolia* entre outras), da região Sul do Brasil foram destacadas no trabalho de Allem & Waechter (1977). Na sinopse de Webster & Armbruster (1991), discute-se ainda, a reorganização e a segregação das seções e subseções de *Dalechampia*, buscando uma melhor distribuição para esses táxons. Os mesmos autores enfatizaram a necessidade de estudos detalhados com enfoque na seção *Dalechampia* subseção *Triphyllae*, devido a dificuldades na delimitação de algumas espécies e a fim de atualizar as informações sobre a distribuição geográfica e o estado de conservação das mesmas.

Conforme dados disponibilizados pela Flora do Brasil 2020 (em construção), das 16 espécies citadas para a região Sul do Brasil apenas quatro delas têm dados em relação ao grau de ameaça: *D. glechomifolia* Baill. e *D. weddelliana* Baill. (pouco preocupante), *D. leandrii* Baill. (quase ameaçada) e *D. riparia* L.B. Sm. & Downs (criticamente em perigo).

Pode ser observado no Species Link (2016) que os exemplares de *Dalechampia* em sua maioria, são oriundos de coletas bastante antigas, demonstrando o quanto este grupo foi negligenciado. Percebe-se assim, que há uma grande falta de informações sobre o gênero e devido a isso, serão necessárias muitas expedições a campo para averiguar uma ocorrência atual.

Das 121 espécies de *Dalechampia* citadas para o Novo e Velho Mundo (IUCN 2016) apenas dez delas foram avaliadas citogeneticamente a partir da contagem do número cromossômico (Tropicos 2016; Rice *et al.* 2015) e nenhuma quanto ao tamanho do genoma (Data Base Kew 2016).

## **OBJETIVO GERAL**

- i. Realizar um estudo taxonômico do gênero *Dalechampia* L. na região Sul do Brasil, caracterizando citogeneticamente as espécies e relacionando essas informações com a evolução cromossômica da família.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Levantar os dados florísticos das espécies nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul;
- ii. Averiguar se houve restrição ou ampliação das espécies na região Sul;
- iii. Esclarecer problemas de identificação e nomenclaturais;
- iv. Descrever as características morfológicas das espécies;
- v. Fornecer dados de floração e frutificação e ecológicos;
- vi. Elaborar chaves dicotômicas e ilustrações dos táxons confirmados.
- vii. Determinar o número cromossômico de oito espécies;
- viii. Avaliar a morfologia e viabilidade polínica;
- ix. Estimar o conteúdo de DNA das oito espécies.

## **PERGUNTAS**

- A diversidade de espécies de *Dalechampia* L. na região Sul do Brasil está sendo subestimada na literatura atual?

- Qual o número cromossômico básico para as espécies de *Dalechampia* ocorrentes na região Sul do Brasil?

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Taxonomia

A metodologia utilizada baseia-se no estudo taxonômico usual através de revisões bibliográficas e de herbários e coletas de material a campo. As expedições para coleta de material e revisões de herbários terão como fim embasar as posteriores descrições de cada espécie, através da análise de caracteres morfológicos diagnósticos mais relevantes.

#### 1.1 Revisão bibliográfica

Será realizado o levantamento de informações bibliográficas referentes aos aspectos gerais do gênero e das espécies, sendo que as *Opera princeps* serão consultadas para subsidiar o conhecimento, as identificações e as descrições. Além disso, outras ferramentas serão utilizadas para a pesquisa como o Portal de Periódicos da CAPES, Web of Science e Jstor .

#### 1.2 Revisões de herbário

Serão revisados os principais herbários do **Rio Grande do Sul**: ICN (Herbário da Universidade do Rio Grande do Sul), PACA (Instituto Anchieta de Pesquisas, São Leopoldo) e HAS (Herbário da Fundação Zoobotânica); **Santa Catarina**: FLOR (Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina), HBR (Herbário Barbosa Rodrigues) e FURB (Herbário Dr. Roberto Miguel Klein) e **Paraná**: MBM (Herbário do Museu Botânico Municipal), FUEL (Herbário da Universidade Estadual de Londrina), UPCB (Herbário do Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná). Além disso, será solicitado aos herbários menores da região Sul o empréstimo de materiais representativos, em bom estado, para auxiliar na pesquisa. As imagens dos *typus* serão levantadas através do registro fotográfico quando disponibilizadas pelos herbários. Os acrônimos referentes aos herbários são citados de acordo com Thiers (2013). A partir de uma busca na ferramenta Species Link (2016), foram observados em quais herbários da região Sul havia exemplares do gênero obtendo-se informações relacionadas à procedência das coletas, período de floração e outros dados relevantes.

As informações obtidas no material examinado auxiliarão nas descrições de cada espécie, sendo observada sua morfologia, dados ecológicos, informações quanto à floração e frutificação, a distribuição geográfica e qualquer outra informação pertinente, permitindo assim, o enriquecimento dos espécimes.

#### 1.3 Expedições a campo

As saídas a campo visam à coleta de material em todas as regiões fisiográficas da região Sul do Brasil, principalmente em locais onde apresenta fisionomia vegetal pertinente às espécies estudadas. Tem ainda a finalidade de observar, fotografar, verificar o hábito e habitat das espécies e obter dados de floração/frutificação e ecológicos dos espécimes. As expedições coincidirão com a época de floração e frutificação das espécies de setembro/2016 a dezembro/2017.

#### 1.4 Análise morfológica

Esta etapa será realizada no Laboratório de Angiospermas (LABTAX) do Departamento de Botânica. A identificação do material botânico coletado será feita a partir da utilização de chaves analíticas e da comparação com os materiais de herbário previamente identificados por especialistas ou até mesmo pelas imagens *online* dos

exemplares *typus*. A descrição das espécies do gênero *Dalechampia* será baseada em caracteres morfológicos - reprodutivos e vegetativos - bem como o seu hábito. Serão elaboradas chaves analíticas das espécies, quando possível com auxílio das chaves existentes para as espécies encontradas nos Estados. Ilustrações das espécies quanto ao hábito e as suas estruturas vegetativas e reprodutivas serão realizadas através de câmara-clara acoplada ao microscópio estereoscópico.

Após o término das análises e identificações, o material botânico será depositado no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e se houver duplicatas, estas serão encaminhadas aos herbários que disponibilizaram material para a realização da pesquisa.

## 2. Análises Citogenéticas

Botões florais e frutos serão coletados no período de setembro/2016 a dezembro/2017 para as análises citogenéticas. Folhas frescas serão coletadas para a determinação do conteúdo de DNA. As análises serão desenvolvidas no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética.

### 2.1 Material vegetal e análises convencionais de citogenética

Serão coletados três exemplares de cada espécie por população, sendo elas *D. anomala*, *D. bangii*, *D. glechomifolia*, *D. micromeria*, *D. reitzkleinii*, *D. riparia*, *D. ulmifolia* e *D. weddelliana*.

A determinação de números cromossômicos será realizada mediante análises mitóticas e/ou meióticas dependendo da disponibilidade de material (botões florais ou frutos) no momento das coletas.

Para a análise de cromossomos mitóticos serão utilizadas raízes obtidas a partir da germinação de sementes ou diretamente das plantas cultivadas. As raízes serão pré-tratadas com o agente anti-mitótico 8-hidroxiquinoleína (2mM) a 18° C por 4 horas, seguidas de fixação em solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido – acético) por 1 à 24h à temperatura ambiente. O material será armazenado a 4°C para posterior preparo das lâminas.

Para a determinação do número cromossômico será empregado método de Feulgen de coloração convencional, sendo analisadas pelo menos cinco metáfases por população por espécie.

O preparo das lâminas envolverá lavagem das raízes em água destilada por 10 minutos seguida de hidrólise em HCl 5N por 30 minutos. A coloração das pontas de raiz será feita com Reativo de Schiff, em ambiente escuro, por 1 hora. Após a coloração, realizar-se-á a digestão enzimática das raízes em solução de macerozima 2% e celulase

20% a 37°C por 20 minutos. O material será esmagado em uma gota de ácido acético 45% e coberto por lamínula.

Para a determinação do número cromossômico através de meiose, serão coletados botões florais jovens, os quais serão fixados em solução de Carnoy 3:1 (etanol: ácido – acético) por 1 à 24h à temperatura ambiente. As lâminas serão confeccionadas por esmagamento das anteras em carmim propiônico 2%. A contagem cromossômica será realizada a partir de células mãe de pólen nas fases de diacinese e anáfase I.

As análises citogenéticas e os registros fotográficos serão realizados em fotomicroscópio Zeiss Axioplan e usando o software Axio Vision.

## **2.2 Viabilidade dos grãos de pólen**

Para a análise da viabilidade dos grãos de pólen, botões florais serão coletados antes da antese e fixados em Carnoy 3: 1 (etanol: ácido acético) por 24 horas a temperatura ambiente, e posteriormente armazenados em álcool etílico 70% à temperatura de – 18°C.

As lâminas serão preparadas a partir de maceração e coloração das anteras utilizando a técnica de Alexander (Alexander 1980). A contagem dos grãos de pólen viáveis e inviáveis será feita com microscópio optico Zeiss Axioplan com lente objetiva de 20x. Serão analisados 500 grãos de pólen por população.

Os grãos de pólen serão classificados de acordo com seu tamanho, forma e coloração, sendo para tanto realizadas as medidas do comprimento e largura dos grãos mediante o de ferramentas do programa Axio Vision. Serão medidos 20 grãos de pólen por planta. Serão analisados três indivíduos por população. As medidas permitirão que os grãos de pólen tenham sua morfologia classificada de acordo com Erdtman (1971), a fim de avaliar este como um possível caráter taxonômico.

## **2.3 Nível de ploidia/conteúdo de DNA**

A estimativa do nível de ploidia e do tamanho do genoma será feita através de citometria de fluxo usando 50mg ou 1cm<sup>2</sup> de tecido foliar fresco macerado em tampão Otto I (0.1 M ácido cítrico, 0.5% v/v Tween 20). Após os núcleos em suspensão serão retirados com uma pipeta e filtrados por uma rede de nylon de 42µm. Para a análise das amostras será adicionado: tampão Otto II (0.4 M NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O), RNase e Iodeto de Propídeo. Um indivíduo do mesmo gênero de número cromossômico conhecido será utilizado como amostra padrão. Cerca de 5000 núcleos serão analisados em citômetro de fluxo e pelo menos três indivíduos por espécie serão analisados.

## **EQUIPE**

Profa Dra. Mara Rejane Ritter – orientadora (PPGBOT – UFRGS),  
Profa. Dra. Inês Cordeiro (Instituto de Botânica de SP) – co-orientadora,  
Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos (PPGBM – UFRGS) – colaboradora  
Doutoranda Rafaela Alves Pereira da Silva (PPGBOT – UFRPE) - colaboradora

## **LISTA DE ATIVIDADES**

- I. Disciplinas;
- II. Prova de Proficiência;
- III. Revisão Bibliográfica;
- IV. Revisão de Herbário;
- V. Expedições a campo;
- VI. Análise morfológica;
- VII. Análises citogenéticas;
- VIII. Análise do pólen;
- IX. Redação da Dissertação;
- X. Defesa;
- XI. Submissão dos artigos.

## **ORÇAMENTO**

<b>Descrição</b>	<b>Custos</b>
<b>Revisão de herbários (passagens e diárias)</b>	R\$ 2.500,00
<b>Coletas a campo (combustível e diárias)</b>	R\$ 3.500,00
<b>Material para confecção de exsicatas de herbário</b>	R\$ 300,00
<b>Pranchas com desenhos das espécies</b>	R\$ 1.000,00
<b>Confecção de pôster referente a congressos</b>	R\$ 100,00
<b>Material de consumo para as análises citogenéticas</b>	R\$ 1.000,00
<b>Total:</b>	<b>R\$ 8.400,00</b>

## **CRONOGRAMA**

<b>Atividades</b>	<b>01/2016</b>	<b>02/2016</b>	<b>01/2017</b>	<b>02/2017</b>	<b>01/2018</b>
<b>Disciplinas</b>	x	x	x		
<b>Prova de Proficiência</b>		x			
<b>Revisão Bibliográfica</b>	x	x	x	x	
<b>Revisão de Herbário</b>	x	x	x		
<b>Expedição a campo</b>		x	x	x	
<b>Análise morfológica</b>		x	x	x	
<b>Análises citogenéticas</b>		x	x	x	
<b>Análise do pólen</b>		x	x	x	
<b>Redação da Dissertação</b>				x	x

<b>Defesa</b>	x
<b>Submissão dos artigos</b>	x

### **INFRAESTRUTURA**

Será utilizada a infraestrutura disponibilizada pelo Laboratório de Angiospermas do departamento de Botânica, o Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética e o espaço do Herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para revisões e armazenamento do material botânico, enquanto realiza-se a pesquisa. Nas expedições a campo serão utilizados, se possível, os serviços de transporte/motorista disponibilizados pelo Instituto de Biociências da UFRGS.

### **FINANCIAMENTO**

Os recursos para a realização deste projeto serão solicitados para agências de fomento, através de editais.

### **PREVISÃO DE PUBLICAÇÃO**

Para as possíveis espécies novas, o artigo será submetido à Phytotaxa (B1), o artigo referente à taxonomia será submetido à Iheringia (série Botânica) (B4) e o artigo de citogenética será submetido à Plant Systematics and Evolution (B1).

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALEXANDER, M. P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, v. 55, p. 13-18.
- ALLEM, A.C. & WAECHTER, J.L. 1977. Notas sistemáticas y nuevos sinónimos en Euphorbiaceae de America del Sur – II. **Revista Brasileira de Biologia** 37: 91 – 101.
- APG III. 2012. 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.
- ARMBRUSTER, W.S. 1993. Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with the Neotropical vine *Dalechampia*. **Evolution**, 47: 1480-1505.
- ARMBRUSTER, W.S. 1996. Exaptation, adaptation, and Homoplasy: Evolution of Ecological traits in *Dalechampia* vines. In. Homoplasy: The recurrence of similarity in evolution. **Academic Press** 227 – 243.
- ASCHERSON, P.F.A. 1864. Flora der Provinz Brandenburg. **Erste Abtheilung**. Berlin.
- BAILLON, H. 1858. Etude Generale du Groupe des Euphorbiacées. **Victor Masson**, Paris.
- CARDINAL MC-TEAGUE, W.M. & GILLESPIE, L.J. 2016. Molecular Phylogeny and pollen evolution of Euphorbiaceae tribe Plukenetieae. **Systematic Botany** 41(2): 329 – 347.
- CHASE, M.W. *et al.* 2002. When in doubt, put in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcl* DNA sequences. **Kew Bulletin** 57: 141 – 181.
- DAVIS, C.C. & CHASE, M.W. 2004. Elatinaceae are sister to Malpighiaceae; Peridiscaceae belong to Saxifragales. **American Journal of Botany** 91(2): 262-273.
- EHRENDORFER, F. 1970. Chromosomen Verwandtschaft und Evolution tropischer Holzpflanzen. I. Allgemeine Hinweise. **Osterr. Bot. Z.** 118: 30-37.
- ERDTMAN, G. 1971. Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms: an introduction to palynology. New York: **Hafner Publishing Company**.
- FLORA DO BRASIL 2020. Disponível em <  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/> Acesso em 31 de maio de 2016.
- GAGLIARDI, K.B. 2014. Estudo ontogenético da redução floral em Euphorbiaceae e das estruturas secretoras associadas: anatomia e evolução. Dissertação (Mestrado), **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo** p.103.
- GUERRA, M. 1990. A situação da citotaxonomia das Angiospermas dos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 4: 75 – 86.
- HUTCHINSON, J. 1969. Tribalism in the family Euphorbiaceae. **American Journal of Botany** 56: 738-758.
- INTERNATIONAL UNION for CONSERVATION of NATURE. Disponível em <  
<http://www.catalogueoflife.org/col/browse/tree/id/bf0c359d3834866fab3eafec70c464b4> Acesso em 25 de maio de 2016.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. 2009. Plant Systematics: a phylogenetic approach. 3<sup>a</sup> edition. **Artemed**, Porto Alegre. 612p.

- JUSSIEU, A.L. 1789. Euphorbiaea. *In Genera Plantarum*, p. 384 – 392.
- DATA BASE KEW, ROYAL BOTANIC GARDENS. Disponível em <<http://data.kew.org/cvalues/CvalServlet?querytype=2>> Acesso em 23 de agosto de 2016.
- KÖHLER, E. 1965. Die Pollenmorphologie der biovulaten Euphorbiaceae und ihre Bedeutung für die Taxonomie. *Grana Palynologica* 6: 26-120.
- LINNAEUS, C. 1753. **Species Plantarum**. v.2. Estocolmo. p. 1200.
- LOMBELLO, R.A. & FORNI-MARTINS, E. R. 1998. Cytological studies in climbers of a Brazilian Forest Reserve. *Cytologia* 63: 415 – 420.
- MANGENOT, S. & G. MANGENOT. 1962. Enquête sur les nombres chromosomiques dans une collerction d'especies tropicales . *Rev. Cyt. et Biol. Vég.* 25: 411-447.
- MIEGE, J. 1962. Quatrieme liste de nombres chromosomiques d'especies d'Afrique Occidentale. *Rev. Cytol. Biol. Veg.* 24: 149-164.
- MUELLER, J. Euphorbiaceae. 1866. **Prodrum Systematis Naturalis Regni Vegetabilis**. 15(2): 189-1261.
- PAX, F.A. & HOFFMANN, K. 1919. Euphorbiaceae: Perea. *In: Engler, A. (ed.). Das Pflanzenreich. Engelmann*, Liepzig. Vol. 68: 1-14.
- PAX, F. & HOFFMANN, K. 1914. Euphorbiaceae-Acalypheae -Mercurialinae. p. 397-401. *In: A. Engler. Das Pflanzenreich Regni Vegetabilis Conspectus. Weinhelm, H.R. Engelmann.*
- PAX, F. & K. HOFFMAN. 1931. Euphorbiaceae. **Natürl. Pflanzenfam.** ed. 2, 19c: 11-233.
- PERRY, B. A. 1943. Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. **American of Journal Botany** 30: 527-543.
- PUNT, W. 1962. Pollen morphology of the Euphorbiaceae with special reference to taxonomy. **Wentia** 7: 1-26.
- RICE *et al.* 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. **New Phytol.** 206 (1): 19-26.
- SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. 1988. Euphorbiaceae *In. Flora Ilustrada Catarinense*. P. 408.
- SOUZA-CHIES, T.T. *et al.* 2014. The studies of biodiversity and plant evolution through molecular markers and cytogenetics: examples in Iridaceae and Poaceae. **Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM** 36: 279 – 293.
- SPECIES LINK 2016. Disponível em < <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>> Acesso em 26 de maio de 2016.
- STEBBINS, G .L. 1966. Chromosome variation and evolution. **Science** 152:1463-1469.
- STEVENS, P.F. 2001 onwards. **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 12, July 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>> Acesso em 22 de maio de 2016.
- THIERS, B. 2010. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated and staff. **New York Botanical Gardens Virtual Herbarium**. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/ih>>. Acessado em 15 julho 2016.

- TROPICOS 2016. Missouri Garden Botanical. Disponível em <<http://www.tropicos.org/>>  
Acesso em 10 de junho de 2016.
- VANZELA, A.L.L. *et al.* 1977. Karyotype studies of some species of *Dalechampia* Plum. (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 125: 25 – 33.
- WEBSTER, G.L. 1975. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. **Taxon** 24: 593 -601.
- WEBSTER, G.L. 1989. Three new species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) from Brazil. **Brittonia** 41(1): 1-9.
- WEBSTER, G.L.; ARMBRUSTER, W.S. 1991. A synopsis of the neotropical species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 105: 137 - 177.
- WEBSTER, G.L. 1994a. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 3-32.
- WEBSTER, G.L. 1994b. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 81: 33 – 144.
- WURDACK, K.J., HOFFMANN, P., CHASE, M.W. 20015. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid rbcL and trnL-F DNA sequences. **American of Journal of Botany** 92(8): 1397-1420.