



**KÁTIA FERREIRA MARQUES DE RESENDE**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DE  
*SENNA* MILL. (LEGUMINOSAE-CASSIINAE) DE  
MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG**

**2012**

**KÁTIA FERREIRA MARQUES DE RESENDE**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DE *SENNA* MILL.  
(LEGUMINOSAE-CASSIINAE) DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Giovana Augusta Torres

**LAVRAS – MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Resende, Kátia Ferreira Marques de.

Evolução cariotípica de *Senna* Mill. (Leguminosae-Cassiinae) de Minas Gerais / Kátia Ferreira Marques de Resende. – Lavras : UFLA, 2012.

74 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Giovana Augusta Torres.

Bibliografia.

1. Apomixia. 2. Caesalpinioideae. 3. Citogenética. 4. Conteúdo de DNA. 5. Displóidia. 6. Número cromossômico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.53

**KÁTIA FERREIRA MARQUES DE RESENDE**

**EVOLUÇÃO CARIOTÍPICA EM ESPÉCIES DE *SENNA* MILL.  
(LEGUMINOSAE-CASSIINAE) DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de fevereiro de 2012.

Dra. Aparecida Célia Paula dos Santos	UFSJ
Dra. Mariana Esteves Mansanares	UFLA
Dra. Lisete Chamma Davide	UFLA
Dra. Roselaine Cristina Pereira	UFLA

Dra. Giovana Augusta Torres  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2012**

*A Deus, Criador e Senhor do Universo...*

OFEREÇO

*Aos meus queridos pais, Maria Etelvina e Sérgio, Míria e Ângelo, e às minhas queridas irmãs Rosane e Renata, e ao meu querido sobrinho Lucas e a toda família, pelo apoio, amor incondicional e compreensão.*

*Em especial, ao meu marido Rodrigo, amor além da vida, e aos nossos filhotes Fofitcho e Docinho...*

*Em memória, à minha querida avó Dalva...*

DEDICO

“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.  
Onde houver ódio, que eu leve o amor;  
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;  
Onde houver discórdia, que eu leve a união;  
Onde houver dúvida, que eu leve a fê;  
Onde houver erro, que eu leve a verdade;  
Onde houver desespero, que eu leve a esperança;  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;  
Onde houver trevas, que eu leve a luz.  
Ó Mestre, fazei que eu procure mais  
consolar, que ser consolado;  
compreender, que ser compreendido;  
amar, que ser amado.  
Pois, é dando que se recebe,  
é perdoando que se é perdoado,  
e é morrendo que se vive para a vida eterna.

**Oração de São Francisco de Assis**

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida na realização desse trabalho.

À amiga e orientadora, Giovana Augusta Torres, por todas as oportunidades e ensinamentos, bem como por me dar as mãos nesta caminhada e, juntas, superarmos todos os obstáculos!

À amiga e professora Lisete Chamma Davide, pelas contribuições, gentileza e atenção.

À amiga e professora Vânia Helena Techio, pela disponibilidade, gentileza e atenção

Aos professores Magno, João Bosco, José Airton, César e João Cândido, pelos ensinamentos no decorrer do doutorado.

À amiga e professora Aparecida Célia Paula dos Santos, por todo crédito e confiança depositados desde a minha iniciação científica.

À Dra Mariana Esteves Mansanares e à Dra. Roselaine Cristina Pereira, por disponibilizar sua atenção e seu tempo como membro da banca avaliadora.

A todos da minha Sagrada Família, que sempre acreditaram em mim.

Aos amigos Carlos Eduardo Campos Cambraia e Alessandra Mara Alvarenga Trindade Cambraia, em nome dos quais agradeço a todos os amigos, pelos momentos de alegrias e pela presença constante.

À família do Laboratório de Citogenética da UFLA pelos momentos de aprendizado, alegria e amizade. Em especial, aos meus “filhos” Guilherme Tomaz Braz, Mariana Salomé Rodrigues, Eduardo Henrique Macedo, Clara Mitre do Prado e Caio Túlio Rodrigues Corrêa por todo apoio, auxílio e incentivo.

“Então me diz qual é a graça de já saber o fim da estrada  
quando se parte rumo ao nada?”

*Paulinho Moska e Nilo Romero*

## RESUMO

*Senna* Mill. é um dos gêneros com maior número de espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae), sendo, no Brasil, composto por 80 espécies, 4 subespécies e 55 variedades. Elas ocorrem em campos, beiras de estrada e como pioneiras em florestas em formação. Possuem grande potencial medicinal, ornamental e para produção de madeira e recuperação de áreas degradadas. Este gênero, juntamente com *Cassia* L. sensu stricto e *Chamaecrista* Moench, compõe a subtribo Cassinae (tribo Cassieae). Apesar de confirmada esta subdivisão, o entendimento do caráter monofilético de Cassiinae, da relação filogenética entre esses três gêneros, bem como das relações interespecíficas dentro de cada gênero, precisa ser melhorado com a investigação de um maior número de espécies e inclusão de novas informações biológicas. Com relação à filogenia de *Senna*, das seis seções reconhecidas somente *Psilorhegma* é monofilética, enquanto *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia* são parafiléticas, e *Astroites* e *Paradyction* estão dentro de dois dos sete maiores clados identificados por filogenia molecular de sequências de DNA cloroplastídicas. Com relação aos estudos citogenéticos do gênero, são encontrados os números cromossômicos  $2n = 24, 26, 28$  e  $56$ , com prevalência de  $2n = 28$ , sendo comumente consideradas espécies com comportamento meiótico regular. Em geral, as espécies de *Senna* apresentam núcleos interfásicos dos tipos arreticulado e semi-reticulado, cromossomos relativamente pequenos (1 a 3  $\mu\text{m}$ ) e cariótipos simétricos. Caracterização do núcleo interfásico, do número e da morfometria dos cromossomos e da determinação da quantidade de DNA genômico foi realizada em 11 espécies de *Senna*. Houve variabilidade interespecífica para todas as características avaliadas. Os dados confirmaram poliploidia e disploidia como fenômenos importantes na evolução cariotípica do gênero. No entanto, as informações citogenéticas não foram conclusivas para inferências citotaxonômicas. Observou-se variação cromossômica numérica entre células meristemáticas de um mesmo indivíduo para as espécies *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* e *S. splendida splendida*. *S. rugosa* é uma espécie apomítica facultativa, com variabilidade interpopulacional para grau de expressão da apomixia.

Palavras-chave: Apomixia. Caesalpinioideae. Citogenética. Conteúdo de DNA. Displóidia. Número cromossômico.

## ABSTRACT

*Senna* Mill. is one of the largest genera in Caesalpinioideae (Leguminosae), comprising 80 species, 4 subspecies and 55 varieties in Brazil. Its species can be found in fields, roadsides and as a pioneer in forming forests. They have great potential for medicinal and ornamental purposes, wood extraction and degraded areas recovery. This genus, along with *Cassia* L. sensu stricto and *Chamaecrista* Moench, comprises the subtribe Cassinae (tribe Cassieae). Although this subdivision is confirmed, the understanding of monophyletic nature of Cassiinae, phylogenetic relationship between these three genera, as well as interspecific relations within each genus needs to be improved with a greater number of species and additional biological information. Concerning the phylogeny of the six sections of *Senna*, *Psilorhegma* is recognized as monophyletic, while *Chamaefistula*, *Senna*, *Peirania* are paraphyletic and *Astroites* and *Paradyction* are within two of the seven major clades identified by molecular phylogeny of chloroplast DNA sequences. In *Senna*, chromosome numbers of  $2n = 24, 26, 28$  and  $56$ , with a prevalence of  $2n = 28$ , are described and the species usually have regular meiotic behavior. They also show non-reticulated and semi-reticulated interphasic nuclei, chromosomes relatively small ( $1-3 \mu\text{m}$ ) and symmetrical karyotypes. Description of the interphasic nucleus, chromosome number and morphology, and genomic DNA amount were performed on 11 species of *Senna*. There was interspecific variability for all evaluated characteristics. Data indicate polyploidy and dispoloidy as important phenomena in karyotypic evolution of the genus. However, cytogenetic information was not conclusive for taxonomic inferences. Chromosome number variation among meristematic cells from the same individual was observed for the species *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* and *S. splendida splendida*. *S. rugosa* is facultative apomictic, with interpopulation variability for the degree of expression of apomixis.

Keywords: Apomixis. Caesalpinioideae. Cytogenetics. Chromosome number. Dispoloidy. DNA content.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
2.1 Aspectos de sistemática e evolução de Cassiinae .....	14
2.2 Aspectos citogenéticos de <i>Senna</i> Mill.....	19
2.3 A citogenética como uma ferramenta para a taxonomia vegetal e a caracterização da biodiversidade.....	23
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>29</b>

### SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

<b>ARTIGO 1</b> Evolução cariotípica em espécies de <i>Senna</i> Mill.(Leguminosae-Cassiinae) de Minas Gerais .....	<b>36</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
2.1 Material Botânico .....	41
2.2 Análise citogenética .....	41
2.3 Quantificação de DNA através da citometria de fluxo.....	44
2.4 Análise da ocorrência de poliembrião nos acessos de <i>S. rugosa</i> ....	45
<b>3 RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Leguminosae Juss. é a terceira maior família de fanerógamas e está dividida em três subfamílias, 36 tribos, 730 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005). No Brasil são encontrados 211 gêneros e 2.709 espécies, os quais representam uma amostra significativa da diversidade da família (LIMA et al., 2012). As subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae foram separadas com base em caracteres morfológicos, particularmente nos florais (TUCKER, 2003), sendo consideradas de tamanhos desiguais e não monofiléticas (DOYLE; LUCKOW, 2003; LEWIS et al., 2005; WOJCIECHOWSKI, 2003).

A subfamília Caesalpinioideae compreende quatro tribos, 171 gêneros e cerca de 2.250 espécies, sendo a maioria de seus representantes de distribuição tropical (LEWIS et al., 2005). Dentre os gêneros com o maior número de espécies desta subfamília encontra-se *Senna* Mill., com cerca de 300 (DOYLE; LUCKOW, 2003; LEWIS, 2005), sendo que no Brasil, este é composto por 80 espécies, 4 subespécies e 55 variedades (SOUZA; BORTOLUZZI, 2012). Muitas espécies de *Senna* são arbustos que ocorrem em campos e como pioneiras em florestas em formação, principalmente em suas margens, sendo também comuns em beiras de estrada (BIONDO et al., 2005c), possuindo grande potencial medicinal (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; EVANS; BANSI; SAMUE, 2002; LORENZI; ABREU, 2002; SAMY; IGNACIMUTS, 2001; TONA et al., 2004), ornamental e para a produção de madeira e a recuperação de áreas degradadas (ARATO; MARTINS; FERRARI, 2003).

A subtribo Cassiinae, da tribo Cassieae, da subfamília Caesalpinioideae, é constituída de três gêneros *Cassia* L. sensu stricto, *Chamaecrista* Moench e

*Senna* Mill. (LEWIS, 2005). A existência destes três gêneros distintos, resultantes da subdivisão do gênero *Cassia* L. sensu lato, hoje circunscrita como subtribo Cassiinae, foi inicialmente proposta em 1871 por Bentham, sendo esta divisão reconhecida com base nas características do androceu, corola, arquitetura floral e presença ou ausência de bractéolas (IRWIN; BARNEBY, 1981, 1982). Subseqüentes trabalhos taxonômicos e filogenéticos confirmaram a segregação (BOONKERD; PECHSRI; BAUM, 2005; TUCKER, 1996). Atualmente, a subtribo Cassiinae tem sido considerada monofilética (LEWIS, 2005). No entanto, as análises morfológicas e moleculares com base em sequências de DNA cloroplastídico e marcadores (RAPD, ISSR e AFLP), apesar de confirmarem a divisão nestes três gêneros, são conflitantes com relação ao caráter monofilético de Cassiinae e quanto à relação entre os gêneros (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 2000; HERENDENN; BRUNEAU; LEWIS, 2003a, 2003b; KAJITA et al., 2001; TRIPATHI; GOSWAMI, 2011). Segundo Acharya, Mukherjee e Panda (2011), a filogenia da subtribo Cassiinae necessita ser trabalhada com um maior de número de espécies.

Nesse sentido, é importante a geração de informações adicionais que contribuam para a elucidação das questões taxonômicas que persistem na subtribo. Investigações aprofundadas das características do conjunto cromossômico, bem como dados morfológicos e moleculares aliados às informações filogenéticas estabelecidas podem constituir uma ferramenta valiosa para o entendimento dos mecanismos de evolução cariotípica e suas implicações taxonômicas dentro de um grupo (GUERRA, 2008).

Com relação aos estudos citogenéticos e citotaxonômicos sobre o gênero *Senna*, a maioria descreve o número cromossômico, o comportamento meiótico e a viabilidade polínica, com algumas inferências a respeito da sistemática da subfamília Caesalpinioideae, a qual a subtribo Cassiinae pertence (BIONDO et

al., 2005; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, 2005b; FERREIRA, 2009). Aspectos detalhados da morfologia e morfometria dos cromossomos de algumas espécies de *Senna* foram descritos por Ferreira et al. (2010) e Souza e Benko-Iseppon (2004), sendo que nesse último são apresentados também padrões de bandeamento fluorescente.

O presente trabalho visa entender a evolução cariotípica dentro do gênero *Senna*, e contribuir com a definição, mesmo que parcial, das relações taxonômicas dentro da subtribo Cassiinae, a partir de características citogenéticas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos de sistemática e evolução de Cassiinae

Nas análises filogenéticas moleculares Leguminosae, Faboideae e Mimosoideae parecem representar linhagens monofiléticas (DOYLE et al., 2000; KAJITA et al., 2001; WOJCIECHOWSKI, 2003). Entretanto, Caesalpinioideae, provavelmente é parafilética, compreendendo uma reunião de diversas linhagens não relacionadas, a maioria divergindo relativamente cedo na história da família. Essa subfamília é dividida em cinco tribos: Caesalpineae, Cassieae, Detarieae, Cercideae, a qual foi a primeira a divergir na família, de acordo com dados moleculares, e Macrolobieae que é a mais recente e derivada de Detarieae (DOYLE; LUCKOW, 2003; TUCKER, 2003).

A tribo Cassieae, a qual é considerada um grupo artificial, contém 20 gêneros e cerca de 735 espécies (LEWIS, 2005), sendo dividida por Irwin e Barneby (1981) em cinco subtribos: Ceratoniinae (monogenérica), Dialiinae (com 13 gêneros), Duparquetiinae (monogenérica), Cassiinae (com três gêneros) e Labicheiinae (com dois gêneros). Esta tribo não é monofilética, incluindo ao menos três linhagens separadas, de acordo com análises filogenéticas moleculares (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000). Segundo Lewis (2005), a tribo Cassieae constitui uma reunião de taxa não relacionados, os quais poderão segregar em mais grupos naturais. Por exemplo, *Cassia*, *Senna* e *Chamaecrista* compreendem cerca de 661 espécies, sendo que algumas são mais estritamente relacionadas com a tribo Caesalpinieae. A grande diversidade no desenvolvimento da forma floral, com muitas combinações de organogênese, corrobora a falta de relações entre membros desta tribo (TUCKER, 2003).

A subtribo Cassiinae é a maior, em número de espécies, das cinco subtribos que compõe a tribo Cassieae, sendo composta de três gêneros: *Cassia*

L. sensu stricto, *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill. (IRWIN; BARNEBY, 1981, 1982; LEWIS, 2005). Os três gêneros são superficialmente similares e mostram muitos caracteres especializados, tais como flores de cor amarela, corola pentâmera, heterostemonia dorsiventral e antera com deiscência poricida (BOONKERD; PECHSRI; BAUM, 2005). Estudos feitos com proteínas de sementes (GUAREEB; KHALIFA; FAWZI, 1999), caracteres morfológicos, vegetativos e reprodutivos (DULBERGER; SMITH; BAWA, 1994; GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1988; IRWIN; BARNEBY, 1981, 1982; OWENS; LEWIS, 1989), características ontogenéticas (TUCKER, 1996), sistemática molecular (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 2000; HERENDENN; BRUNEAU; LEWIS, 2003a, 2003b; KAJITA et al., 2001; TRIPATHI; GOSWAMI, 2011) e citogenética (BIONDO et al., 2005; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, 2005b; GOLDBLATT, 1981) corroboram a divisão de Cassinae em três gêneros.

Segundo Doyle et al. (2000), a árvore filogenética consenso baseada em sequências de DNA cloroplastídico (gene *rbcL*) não suporta a monofilia de Cassiinae, com os três gêneros incluídos numa ampla politomia (KAJITA et al.; 2001). As análises moleculares com base em sequências de DNA cloroplastídico (intron *trnL*) de Bruneau et al. (2001) também suportam a hipótese de não monofilia, embora a relação encontrada entre os gêneros, *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* não tenha sido a mesma. Enquanto Doyle et al. (2000) e Kajita et al. (2001) sugerem que *Chamaecrista* e *Senna* sejam taxa irmãos e *Cassia* esteja em um clado distinto, para Bruneau et al. (2001) os três gêneros estão em clados distintos, sendo que *Chamaecrista* constitui um clado irmão do clado B e o clado de *Cassia* é irmão do clado monofilético de *Senna*.

Herendeen, Bruneau e Lewis (2003a) expandiram os estudos de Bruneau et al. (2001) por meio de uma combinação das análises moleculares com base

em sequências de DNA cloroplastídico (intron trnL) com caracteres morfológicos, os quais incluíam aspectos da morfologia vegetativa e anatomia e estruturas das inflorescências, mostrando que *Cassia* não se agrupa com *Senna* e tampouco com *Chamaecrista*, e ainda que esses dois últimos formam um clado. Porém, estes autores relatam que os caracteres florais não foram incluídos nestas análises devido à ausência de dados para todos os taxa. Posteriormente, Herendeen, Bruneau e Lewis (2003b) continuaram os estudos de filogenia aliando análises moleculares com base em sequências de DNA cloroplastídico (intron trnL e trnL-F spacer) e caracteres morfológicos, incluindo a morfologia floral, e encontraram *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* formando um clado, com *Chamaecrista* sendo um grupo irmão aos outros dois gêneros. Desta maneira, esta subtribo, até então, tem sido considerada monofilética (LEWIS, 2005). No entanto deve se considerar que tanto a filogenia de Cassiinae, bem como a filogenia da subfamília Caesalpinioideae, a qual pertence, são complexas e os caracteres morfológicos florais também são complexos, sendo que Herendeen, Bruneau e Lewis (2003b) comenta que em alguns gêneros a existência de flores bissexuais complica o entendimento da história evolucionária da expressão sexual destas plantas.

Os mais recentes estudos envolvendo *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna* (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; TRIPATHI; GOSWAMI, 2011) utilizaram dados de marcadores moleculares (RAPD, ISSR e AFLP), revelando alto grau de diversidade genética entre os taxa de Cassiinae, sendo que os dendrogramas e as análises de agrupamento comprovaram mais uma vez que estes gêneros possuem identidade ao nível molecular, corroborando com a elevação do antigo gênero *Cassia* L. senso lato para o nível de subtribo, subtribo Cassiinae, e a segregação dos três gêneros ao invés de formarem categorias infragenéricas.

Marazzi et al. (2006) começaram a estudar as relações filogenéticas

dentro do gênero *Senna* baseados em análises de sequências de DNA de três regiões cloroplastídicas (*rpSI6*, *rpL16*, e *matK*), desenvolvendo, então, modelos evolutivos de simetria floral e nectários extraflorais (NEFs). Segundo estes autores, estes nectários são comumente encontrados nas folhas e mais raramente nos pedicelos, sendo órgãos atratores de formigas, as quais se alimentam deste néctar protegendo a planta contra herbívoros, formando uma interação oportunística planta-formiga ou mutualismo.

*Senna* Mill. compreende 35 séries distribuídas em seis seções: *Psilorhegma*, *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia*, *Paradyction* e *Astroites* (IRWIN; BARNEBY, 1982). De acordo com Marazzi et al. (2006), destas seis seções reconhecidas somente *Psilorhegma* é monofilética, enquanto *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia* são parafiléticas, e *Astroites* e *Paradyction* estão dentro de dois dos sete maiores clados identificados por essa filogenia molecular. Assim, foram definidos dois clados, os quais incluem somente espécies com flores zigomorfa, enquanto os quatro clados remanescentes contém espécies com flores assimétricas. De acordo com estes autores, evidências filogenéticas e ecológicas sugerem que os NEFs em *Senna*, considerado um gênero não monofilético, podem representar uma inovação nas estratégias de defesa da planta, a qual promoveu diversificação em larga escala e colonização de uma ampla gama de habitats e climas em diferentes continentes, especialmente na América e na Austrália.

Marazzi, Conti e Endress (2007) estudaram a estrutura floral de 69 espécies dos maiores clados de *Senna*, identificando novas características morfológicas. Marazzi e Endress (2008) continuaram os estudos de desenvolvimento floral em 60 espécies de *Senna*, reconhecendo cinco modelos de assimetria floral. Estes dados são congruentes com os clados suportados pela filogenia molecular proposta por estes mesmos autores (MARAZZI et al. 2006).

Mais recentemente, Marazzi e Sanderson (2010) investigaram o tempo e

o modo de diversificação de *Senna*, desenvolvendo modelos em larga escala, visando entender o papel evolutivo dos nectários extraflorais (NEF). Segundo estes autores, em *Senna*, os NEFs caracterizam o maior clado (NEF clado), incluindo 80% das espécies do gênero. Análises moleculares sugeriram que *Senna* originou no início do Eoceno, e que sua maior linhagem tenha surgido entre meados do Eoceno e início do Oligoceno. Os NEFs evoluíram no final do Eoceno, depois da principal radiação das formigas. O clado NEF diversificou rapidamente, tornando-se mais significativo do que as espécies dos clados que não possuem NEFs. Desta maneira estes autores concluem que os NEFs podem ter promovido a colonização de novos habitats, aparecendo com o início dos Andes, o que explicaria a concentração geográfica distinta do clado NEF na América do Sul.

Soladoye et al. (2010) identificaram e diferenciaram oito espécies de *Senna* do sudoeste da Nigéria, baseado em treze caracteres morfológicos quantitativos, bem como interpretaram as similaridades e diferenças usando a taxonomia numérica. As análises de grupo baseadas nos parâmetros quantitativos mostraram que *S. hirsuta* (Linn.) H.S. Irwin e Barneby e *S. sophera* (L.) Roxb. são mais relacionadas; *S. occidentalis* (Linn.) Link, *S. siamea* (Lam.) H. S. Irwin e Barneby e *S. spectabilis* (DC.) Irwin e Barneby mostraram alguma semelhança, enquanto *S. occidentalis* está distantemente relacionada à *S. sophera*.

Outro gênero da subtribo Cassinae que possui estudos com abordagens filogenética de suas seções é *Chamaecrista*. Conceição et al.(2009) estudaram a filogenia do gênero usando dados moleculares de sequências de DNA nuclear (ITS) e plastídicas (trnL-F spacers), representando as seis seções de *Chamaecrista*. A monofilia deste gênero foi altamente suportada pelas análises destes autores, os quais sugeriram que o modelo de diversificação ocorreu através de um deslocamento inicial de árvores para um clado mais diverso de

arbustos de cerrado. Dois suclados foram reconhecidos: (1) um clado com espécies de planalto e de montanha caracterizado por ausência de nectários extraflorais e o aparecimento de pêlos glandulares pegajosos; e (2) um clado com a maioria das espécies herbáceas com inflorescências fasciculadas axilarmente e número cromossômico reduzido.

## 2.2 Aspectos citogenéticos de *Senna* Mill.

A subfamília Caesalpinioideae é considerada poliploide (geralmente  $2n = 14, 16, 22, 24, 26, 28, 32, 48$  e  $52$ ), com a prevalência de tetraploides com o número básico  $x = 7$  (BANDEL, 1974; GOLDBLATT, 1981. As Caesalpinioideae podem ser consideradas um grupo ancestral dentro da família, devido ao fato de suas espécies tenderem a possuir pequenos cromossomos com cariótipos relativamente simétricos (KUMARI; BIR, 1989; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Com relação ao tamanho cromossômico, Souza e Benko-Iseppon (2004) estudaram espécies dos três taxa de Cassiinae, sendo que algumas *Senna* e *Cassia* com o mesmo nível de ploidia apresentaram tamanhos cromossômicos contrastantes.

A subtribo Casiinae pode ser considerada multibásica, com  $x = 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13$  e  $14$  (IRWIN; TURNER, 1960), sendo  $x = 7$  considerado como o número primário básico para esta subtribo, provavelmente responsável pelo estabelecimento do número básico secundário  $x = 14$ , do qual  $x = 13$  e  $12$  podem ter evoluído por meio da diminuição por aneuploidia (ATCHINSON, 1951; BIONDO et al., 2005; GEORGE; BHAVANANDAN, 1993; GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). A literatura demonstra a ocorrência de aneuploidia em âmbito populacional (GEORGE; BHAVANANDAN, 1993; IRWIN; TURNER, 1960) e a existência de citótipos distintos em populações naturais de algumas espécies de Cassiinae

(GOLDBLATT, 1981).

Souza e Benko-Iseppon (2004) analisaram o cariótipo de 13 espécies de Caesalpinioideae (*Bauhinia* L., *Caesalpinia* L., *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*) e Faboideae (*Bowdichia* Kuntch, *Centrosema* (DC.) Benth. e *Dioclea* Kunth) coletados em 17 populações naturais do Pará (Amazonas). Diferenças significativas no tamanho cromossômico, morfologia e comportamento de condensação entre os membros analisados da subtribo Cassiinae (*Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*) revelaram que esta subtribo é um grupo heterogêneo, do ponto de vista cariológico. Bandeamento com fluorocromos, feito pela primeira vez em Caesalpinioideae, revelou discretas bandas terminais CMA+/DAPI-, ricas em G/C, nos pares cromossômicos dois e quatro da maioria das espécies analisadas, com poucas espécies apresentando discretas bandas CMA-/DAPI+, ricas em A/T.

Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2005a) determinaram o número de cromossomos e analisaram o comportamento meiótico de onze espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae ocorrentes na região sul do Brasil. O número de cromossomos na maioria das espécies analisadas foi  $2n = 28$ , sendo encontrado  $2n = 24$  em *Senna multijuga* (L.C. Rich.) H. S. Irwin & Barneby, e  $2n = 26$  em *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. Os núcleos apresentaram padrão arreticulado e o comportamento meiótico foi regular em todas as espécies analisadas. Análises detalhadas do comportamento meiótico de populações de espécies de leguminosas naturais demonstram que a maioria geralmente mostra comportamento regular, alto índice meiótico e alta viabilidade do grão de pólen (BIONDO et al., 2005a). Os autores sugerem ampliação das coletas e análises citogenéticas em mais indivíduos e espécies, de forma a gerar informações adicionais que permitam conclusões mais abrangentes a respeito da estrutura genética e dos sistemas reprodutivos, que ainda são pouco conhecidos na subfamília Caesalpinioideae, para melhor entendimento da sua evolução.

Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2005b) descreveram o número cromossômico de espécies de 10 gêneros pertencentes às tribos Cassieae, Caesalpinieae e Cercideae, totalizando 74 acessos de 27 taxa. Os números encontrados foram  $2n = 32, 28, 26, 24, 22, 16$  e  $14$ . A maioria das espécies apresentou  $2n = 28$  cromossomos. *Chamaecrista* diferenciou-se dos demais gêneros por apresentar  $2n = 32, 16$  e  $14$  cromossomos, sendo  $2n = 32$  supostamente originado por poliploidização. O número básico proposto foi de  $x = 14$  para as espécies de nove gêneros estudados, com os demais números  $x = 13, 12$  e  $11$ , tendo surgido, provavelmente, por aneuploidia. Para *Chamaecrista*, o número básico sugerido foi  $x = 8$  para a maioria das espécies. O caráter número de cromossomos mostrou-se relevante na distinção de táxons do gênero *Chamaecrista* dos demais gêneros. Desta maneira, os autores sugerem a separação de *Chamaecrista* dos demais gêneros pertencentes à subtribo Cassiinae, baseados no caráter número cromossômico, juntamente com outros caracteres analisados e encontrados na literatura. Os autores comentam, no entanto, que esta afirmação possa ser prematura, principalmente devido ao pequeno volume de informações. Assim, Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2005b) ressaltam que muitas espécies ainda não foram analisadas e nem revisadas taxonomicamente, sendo necessários mais estudos taxonômicos e biosistemáticos para confirmar esta separação.

Biondo et al. (2005c) analisaram o número cromossômico, o comportamento meiótico, o índice meiótico e a viabilidade do grão de pólen em 17 espécies de *Senna* ocorrentes no sul do Brasil. Os números cromossômicos encontrados foram  $2n = 22, 24, 26, 28$  e  $56$ . Nenhuma variabilidade intraespecífica foi detectada, com  $n=14$  predominando. Segundo estes autores, seus resultados suportam a hipótese que tem sido previamente sugerida por outros autores (GOLDBLATT, 1981; IRWIN; TURNER, 1960; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004), de que  $x = 14$  é o número básico para *Senna*,

provavelmente sendo um número básico derivado, e que os outros números poderiam refletir a disploidia como uma tendência evolucionária do gênero. Somente o acesso de *Senna rugosa* (G. Don) H. S. Irwin e Barneby mostrou ser tetraploide, em contraste com as referências prévias para esta espécie. O comportamento meiótico foi regular para todas as espécies e acessos, mas algumas irregularidades, tais como uni e multivalentes e segregação desigual, foram ocasionalmente observadas. Os índices meióticos foram altos, em torno de 95%. A média da viabilidade polínica foi cerca de 81% para todas as espécies, mas, para alguns taxa, valores muito baixos foram encontrados em alguns acessos.

Ferreira (2009) caracterizou e comparou número cromossômico, comportamento meiótico e viabilidade do grão de pólen de onze espécies de *Senna* incidentes no sul do estado de Minas Gerais. As espécies analisadas apresentaram  $n = 12, 13, 14,$  e  $28$  cromossomos, sendo o comportamento meiótico de *Senna alata* (L.) Roxburgh, *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin e Barneby, *S. silvestres* (Vell.) H. S. Irwin e Barneby var. *bifaria* H. S. Irwin e Barneby e *S. spectabilis* (DC.) H. S. Irwin e Barneby descritos pela primeira vez. Foram identificados acessos com  $n=14$  e  $n=28$  em *S. rugosa* (G. Don) H. S. Irwin e Barneby, nos quais foi demonstrada a existência de quadrivalentes. A ocorrência desse tipo de pareamento evidenciou uma homeologia entre complementos cromossômicos, gerando uma discussão sobre o número básico do gênero, sugerindo uma ocorrência de ciclos anteriores de poliploidização no processo evolutivo de *Senna*. A maioria das espécies analisadas apresentou comportamento meiótico regular, alto índice meiótico e alta viabilidade do grão de pólen.

Comportamento meiótico, morfologia polínica, classificação de núcleo interfásico e descrição cariotípica para acessos da espécie *Senna occidentalis* (L.) Link, do sul de Minas Gerais, foram apresentados por Ferreira et al. (2010).

Esta espécie apresentou núcleo interfásico do tipo arreticulado e condensação cromossômica homogênea, com minutas porções de condensação distal atrasada na prometáfase. O número de cromossomos relatados foi de  $2n = 28$  (9 m + 5 sm), com constrição secundária num par cromossômico. Foram detectados quatro nucléolos, com coloração com nitrato de prata, indicando a existência de dois pares cromossômicos com Região Organizadora do Nucléolo (RON). O comportamento meiótico foi regular, com alto índice meiótico (95%). O grão de pólen foi classificado como polar esferoidal, apresentando 90% de viabilidade.

### **2.3 A citogenética como uma ferramenta para a taxonomia vegetal e a caracterização da biodiversidade**

Dentre as maneiras de se estudar a citogenética dos diferentes grupos vegetais, os caracteres número e tamanho dos cromossomos metafásicos mitóticos assim como sua morfologia, presença de constrições secundárias e padrões de distribuição da heterocromatina auxiliam na distinção de plantas morfológicamente similares, sendo excelente ferramenta para a taxonomia, para o melhoramento genético e para estudos genéticos com vegetais, uma vez que tais informações podem ser úteis na identificação e caracterização de espécies e híbridos, bem como para o entendimento da evolução das mesmas (CLARK; WALL, 1996; GUERRA, 2008; SHAN; YAN; PLUMMER, 2003).

Com o refinamento das técnicas citogenéticas, mais respostas têm sido alcançadas com o estudo dos cromossomos vegetais, já que alguns taxa com problemas taxonômicos que possuem o cariótipo estável necessitam de outras técnicas, além daquelas utilizadas na citogenética convencional, para revelarem sua variação (SUMNER, 1990).

Entre essas técnicas, as mais empregadas são o bandeamento C, que revela as regiões heterocromáticas, e a coloração com fluorocromos CMA<sub>3</sub> e

DAPI, que permitem uma coloração diferencial ao longo dos cromossomos. A utilização de fluorocromos tem permitido identificar diferentes tipos de heterocromatina com base na propriedade de corarem mais ou menos intensamente os segmentos ricos em determinados pares de bases, destacando-se entre eles a cromomicina A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) e a quinacrina, específicos para regiões ricas em GC, assim como o Hoechst 33258 e o DAPI, específicos para regiões ricas em AT (SUMNER, 1990).

Além do bandeamento cromossômico, a técnica de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) tem sido amplamente utilizada, possibilitando a observação de regiões específicas a partir de sondas que se hibridizam com seqüências de DNA complementares ao longo dos cromossomos (GUERRA, 2004).

Smarda et al. (2005) e Smarda e Koci (2003) realizaram estudos com espécies representantes do subgênero *Festuca* L. (Poaceae), as quais apresentaram grande similaridade morfológica. Apenas por tais caracteres, a identificação e caracterização dos vários taxa têm sido muito problemática e às vezes impossível para os taxonomistas. Nesse caso, o nível de ploidia tem sido usado como critério básico de classificação e descrição destas espécies, sendo possível inclusive a separação de sinonímias.

Artelari e Georgiou (2003) utilizaram dados citogenéticos e do sistema de reprodução para sinonimizar duas espécies de *Limonium* Mill. (Plumbaginaceae), uma vez que apresentaram o mesmo número cromossômico, diversas similaridades morfológicas e se reproduziam através de mecanismos apomíticos.

Número cromossômico, comportamento meiótico e viabilidade polínica foram determinados por Conterato e Wittmann (2006) para 20 espécies americanas de *Lupinus* L. (Leguminosae), visando obter contribuições para os estudos taxonômicos e evolucionários. Estes autores relataram que os resultados obtidos, juntamente com dados da literatura, suportam a hipótese de que as

espécies do sudoeste do Sul Americano são um grupo citologicamente diferenciado das espécies dos Andes, bem como outras espécies americanas, e que as espécies de *Lupinus* unifoliadas brasileiras e norte americanas têm origens independentes.

Com relação a taxa que necessitam de outras técnicas citogenéticas, além das convencionais, para auxiliar na distinção de espécies, pode-se citar o gênero *Cycas* (Cycadaceae), o qual apresenta espécies e subespécies com número e morfologia cromossômica bastante estável, possuindo, no entanto, uma quantidade e qualidade variável de heterocromatina, sendo que Kokubugata e Kondo (1996), por meio de bandeamentos fluorescentes com coloração de CMA<sub>3</sub> e DAPI, conseguiram delimitar espécies e subespécies neste gênero, a partir de diferenças no padrão heterocromático.

Urdampilleta et al. (2005), ao estudarem duas espécies de *Koelreuteria* Laxm. (Sapindaceae), observaram que apesar de ambas apresentarem cariótipos muito semelhantes, o padrão de bandamento C terminal e CMA permitiram diferenciar as espécies.

Técnicas de bandamento podem auxiliar também na identificação de parentais de híbridos. A partir do padrão de banda C observado em alguns tetraplóides de *Medicago* L., por exemplo, foi possível estabelecer que os mesmos são híbridos formados pelo cruzamento de duas subespécies de *Medicago sativa* L. Esses autores verificaram que alguns tetraplóides neste gênero apresentam um genoma com bandas C centroméricas e outro com bandas C centroméricas e teloméricas, que são os padrões observados nas subespécies diplóides *Medicago sativa* L. subsp. *caerulea* (Less. ex Ledeb.) Schmalh. e *Medicago sativa* subsp. *falcata* L., respectivamente (BAUCHAN; HOSSAIN, 1997).

Lim (2006) apresentaram um robusto trabalho de filogenia, sustentado por dados citogenéticos, para *Nicotiana* L. Neste trabalho, a partir da análise de

cromossomos submetidos à técnica de FISH, com a utilização de sondas teloméricas, DNA ribossomal 5S e 45S e outras sondas de seqüências de DNA repetitivo, os autores conseguiram enriquecer vastamente as relações entre as espécies da seção *Tomentosae*. Para os autores, a partir de ganhos, perdas e ampliações destas seqüências analisadas em seis espécies diplóides e no alotetraplóide *N. tabacum* L. (tabaco), foi possível reconhecer que *N. glutinosa* L., incluída na seção *Tomentosae*, é pouco relacionada às demais espécies da seção e que *N. tomentosiformis* Goodsp. é um dos ancestrais diplóides do tabaco, sendo que o outro ancestral é *N. silvestris*.

Em *Clivia* (Amaryllidaceae), um gênero de plantas herbáceas com flores ornamentais, foi possível estabelecer a evolução cariotípica do grupo a partir da observação de variações do número e posição dos sítios de DNAr 5S e 45S. Observou-se também que a cultivar Robust Gardenii, realmente pode ser classificada como uma nova espécie, visto que a distribuição de sítios ribossomais apresenta um padrão totalmente diferente da espécie a qual pertence *Clivia gadenii* (RAN; HAMMETT; MURRAY, 2001).

No gênero *Lens* Mill. (Leguminosae), por meio da utilização de sondas de DNA ribossômico 18S e 5.8S e 5S foi possível mapear os cromossomos de todas as espécies e identificar diferenças moleculares entre elas (BALYAN; HOUBEN; AHNE, 2002).

O número cromossômico básico proposto para *Passiflora* L. (Passifloraceae) é  $x = 6$ , com  $x = 9$ ,  $x = 10$  e  $12$  sendo considerados números básicos secundários. Melo e Guerra (2003) investigaram a variabilidade dos sítios de DNA ribossômico 5S e 45S em 20 espécies brasileiras, através da hibridização *in situ* fluorescente, visando checar esta hipótese. De acordo com estes autores, o número e a localização dos sítios de DNA ribossômico 5S e 45S foram consistentes com a hipótese de  $x = 6$  como um provável genoma ancestral para o gênero, enquanto os grupos de espécies com  $x = 9$ ,  $10$  e  $12$  foram

considerados de origem tetraploide, com disploidia descendente e silenciamento gênico de alguns sítios gênicos redundantes, principalmente aqueles de rDNA 5S.

Mlinarec, Papes e Besendorfer (2006), conseguiram realizar todo o mapeamento da heterocromatina e a localização correta das constrições secundárias com fluorocromos e sondas de RNA ribossomal em *Anemone hortensis* L. (Ranunculaceae). Bandas DAPI foram todas positivas para sondas teloméricas de DNA repetitivo TTTAGGG, mostrando que algumas bandas DAPI positiva intercalares podem ter se originado por inversões ou translocações de segmentos cromossômicos terminais nesta espécie de planta.

A quantidade de DNA nuclear também pode fornecer informação valiosa para definir relações taxonômicas (LOUREIRO et al., 2007), especialmente quando associada ao número e morfologia dos cromossomos das espécies. Por meio de citometria de fluxo é possível mensurar o conteúdo de DNA de núcleos, permitindo inferir o nível de ploidia, fazer comparações intra e interespecíficas do tamanho nuclear e avaliar o teor de DNA de cada cromossomo do complemento de uma espécie (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2001).

Marhold et al. (2010) avaliaram a variação do nível de ploidia interespecífico em espécies asiáticas de *Cardamine* L. (Brassicaceae), através de análises cariológicas, contagem cromossômica e da quantidade de DNA, por meio de citometria de fluxo. Foi observada uma diversidade citotípica, por meio de variação do nível de ploidia e do tamanho do genoma, os quais foram sugeridos ser causados por aneuploidia. Os autores relataram que estes dados são essenciais para estudos filogenéticos e evolucionários.

Campos et al. (2011) estimaram por citometria de fluxo o valor da quantidade de DNA de 28 espécies brasileiras de *Lippia* L. (Verbenaceae). Os valores C encontrados apresentaram baixa correlação com número

cromossômico. As duas espécies mais discrepantes, com alta quantidade de DNA, já haviam sido objeto de discussão para transferência para o gênero *Lantana* L, com base em informações sobre hábitos e morfologia. Os dados confirmaram relatos prévios de variação dentro das seções taxonômicas e sugerem uma revisão na seção *Zapania*.

Catalán et al. (2012) realizaram um estudo multidisciplinar em uma amostra representativa de três citótipos de *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv. (Poaceae), sendo esta espécie considerada um modelo de planta para os cereais temperados. Estes autores objetivaram investigar suas origens e relações evolucionárias e elucidar se elas representam espécies separadas. Análises citogenéticas foram conduzidas por citometria de fluxo, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas de sequências genômicas (GISH) e de sequências múltiplas de DNA, e pintura cromossômica comparativa (CCP). Análises filogenéticas foram baseadas em dois genes plastídicos e em cinco genes nucleares de diferentes linhagens de *Brachypodium* P.Beauv., estimando divergência temporal e proporções evolutivas. As diferenças fenotípicas, citogenéticas e moleculares detectadas entre os três citótipos de *B. distachyon* são indicativas de um processo de especiação dentro deste complexo, sugerindo sua separação taxonômica em três espécies distintas.

Desta maneira, os caracteres citogenéticos podem ser considerados poderosos para inferências em relações filogenéticas, sendo que uma abordagem multidisciplinar, por meio da combinação de informações citogenéticas convencionais e moleculares, entre outras, pode permitir análises filogenéticas em concordância com os princípios e conceitos de cladística, possibilitando a elucidação de questões taxonômicas e estudos evolucionários (DOBGINY et al., 2004; STACE, 2000).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K.; PANDA, P. C. Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 223-233, Jan./Feb. 2011.
- ARATO, H. D.; MARTINS, S. V.; FERRARI, S. H. S. Produção e decomposição de serapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 715-721, set./out. 2003.
- ARTELARI, R.; GEORGIU, O. Biosystematic study of the genus *Limonium* (Plumbaginaceae) in the Aegean area, Greece: III., *Limonium* on the Islands Kithira and Antikithira and the surrounding islets. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 22, n. 2, p. 483-501, 2003.
- ATCHINSON, E. Studies in Fabaceae: VI., chromosome number among tropical woody species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, p. 538-547, 1951.
- BALYAN, H. S.; HOUBEN, A.; AHNE, R. Karyotype analysis and physical mapping of 18S-5.8S and 5S ribosomal RNA loci in species of genus *Lens* Miller (Fabaceae). **Caryologia**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 121-128, 2002.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Fabaceae. **Caryologia**, Tokyo, v. 27, n. 1, p. 17-32, 1974.
- BAUCHAN, G. R.; HOSSAIN, M. A. Karyotypic analysis of C-Banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 6, p. 533-537, Nov. 1997.
- BIONDO, E. et al. Cytogenetics and cytotaxonomy of brazilian species of *Senna* Mill. (Cassieae - Caesalpinioideae - Leguminosae). **Caryologia**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 152-163, Apr./June 2005.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae: Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248, 2005a.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 797-808, out./dez. 2005b.

BOONKERD, T.; PECHSRI, S.; BAUM, B. R. A phenetic study of *Cassia sensu lato* (Leguminosae - Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae) in Thailand. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 252, n. 3/4, p. 153-165, May 2005.

BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**, New York, v. 3, n. 26, p. 487-514, July/Sept. 2001.

CAMPOS, J. M. et al. Chromosome numbers and DNA C values in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 291, n. 1, p. 133-140, Feb. 2011.

CATALÁN, P. et al. Evolution and taxonomic split of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Annals of Botany**, London, v. 109, n. 2, p. 1-20, Feb. 2012.

CLARK, M. S.; WALL, W. J. **Chromosomes the complex code**. London: Chapman and Hall, 1996. 243 p.

CONCEIÇÃO, A. S. et al. Phylogeny of *Chamaecrista* Moench (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on nuclear and chloroplast DNA regions. **Taxon**, Utrecht, v. 58, n. 4, p. 1168-1180, Nov. 2009.

CONTERATO, I. F.; WITTMANN, M. T. S. New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (Leguminosae): contributions to taxonomic and evolutionary studies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 2, p. 229-240, Feb. 2006.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

DOBIGNY, G. et al. Cytogenetics and cladistics. **Systematic Biology**, Kent, v. 53, n. 3, p. 470-484, June 2004.

DOYLE, J. J. DNA data and legume phylogeny: a progress report. In: CRISP, M. D.; DOYLE, J. J. (Ed.). **Advances in legume systematics: phylogeny**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p. 11-30.

DOYLE, J. J. et al. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P. S.; BRUENAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. p. 1-20.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 900-910, Mar. 2003.

DULBERGER, R.; SMITH, M. B.; BAWA, K. S. The stigmatic orifice in *Cassia*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Caesalpinaceae): morphological variation, function during pollination, and possible adaptive significance. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 11, p. 1390-1396, Nov. 1994.

EVANS, C. E.; BANSI, A.; SAMUE, O. A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi* in vitro study. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 80, n. 1, p. 21-24, Apr. 2002.

FERREIRA, K. **Citogenética e palinologia das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae (FABACEAE) do sul de Minas Gerais**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Berlin, v. 65, n. 5, p. 789-795, Sept. 2010.

GEORGE, S. M.; BHAVANANDAN, K. V. Cytological studies in some species of *Cassia* from south India. **Journal of Cytology and Genetics**, Bangalore, v. 28, n. 1, p. 1-5, Apr. 1993.

GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981. p. 427-463.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of flower structures and pollination in neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. **Phyton**, Horn, v. 28, n. 2, p. 293-320, 1988.

GUAREEB, A.; KHALIFA, S. F.; FAWZI, N. Molecular systematics of some *Cassia* species. **Cytologia**, Florence, v. 64, n. 1, p. 11-16, 1999.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 120, n. 3/4, p. 339-350, May 2008.

\_\_\_\_\_. **FISH: conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p.

HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A.; LEWIS, G. P. Floral morphology in caesalpinoid legumes: testing the monophyly of the 'Umtiza clade'. **International Journal of Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. S393-S407, 2003a. Supplement.

\_\_\_\_\_. Phylogenetic relationships in Caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics: higher level systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003b. p. 37-62.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZER, T. Flow cytometry and chromosome sorting. **Methods in Cell Science**, Norwell, v. 23, n. 1/3, p. 115-124, Mar. 2001.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. American Cassiinae: a synoptical revision Leguminosae, Tribe Cassieae, subtribe Cassiinae in New World. **Memorial New York Botanical Garden**, New York, v. 35, n. 1/2, p. 1-918, 1982.

\_\_\_\_\_. *Cassieae*. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 97-106.

IRWIN, H. S.; TURNER, B. L. Chromosomal relationships and taxonomic considerations in the genus *Cassia*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 47, n. 4, p. 309-318, Apr. 1960.

KAJITA, T. et al. *RbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botanic**, New York, v. 23, n. 3, p. 515-536, July/Sept. 2001.

KOKUBUGATA, G.; KONDO, K. Comparative karyotype analysis of *Ceratozamia mexicana* and *Microcycas calocoma* (Zamiaceae) using fluorochrome banding (CMA/DAPI) and fluorescence in situ hybridization of ribosomal DNA. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 210, n. 1/2, p. 41-50, 1996.

- KUMARI, S.; BIR, S. S. Karyomorphological evolution in Caesalpiniaceae. **Journal of Cytology and Genetics**, Bangalore, v. 24, n. 2, p. 149-163, 1989.
- LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.
- LEWIS, G. P. Cassieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.). **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. p. 111-125.
- LIM, K. Y. Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. **The Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 907-919, Dec. 2006.
- LIMA, H. C. de et al. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- LORENZI, H.; ABREU, F. J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Intituto Plantarum, 2002. 512 p.
- LOUREIRO, J. et al. Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Península *Festuca* spp. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 269, n. 1/2, p. 89-105, Nov. 2007.
- MARAZZI, B.; CONTI, E.; ENDRESS, P. K. Diversity in anthers and stigmas in the buzz-pollinated genus *Senna* (Leguminosae Cassiinae). **International Journal of the Plant Science**, Amsterdam, v. 168, n. 4, p. 371-391, Aug. 2007.
- MARAZZI, B.; ENDRESS, P. K. Patterns and development of floral asymmetry in *Senna* (Leguminosae, Cassiinae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 95, n. 1, p. 22-40, Jan. 2008.
- MARAZZI, B. et al. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectarines. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 93, n. 2, p. 288-303, 2006.
- MARAZZI, B.; SANDERSON, M. J. Large-scale patterns of diversification in the widespread legume genus *Senna* and the evolutionary role of extrafloral nectarines. **Evolution**, Lancaster, v. 64, n. 12, p. 3570-3592, Dec. 2010.

MARHOLD, K. et al. Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploidy *Cardamine* (Brassicaceae) species. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 2, p. 249-264, Feb. 2010.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, London, v. 92, n. 2, p. 309-316, Aug. 2003.

MLINAREC, J.; PAPES, D. A.; BESENDORFER, V. Ribosomal, telomeric and heterochromatinsequencis localization in the karyotype of *Anemone hortensis*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 1, p. 177-186, 2006.

OWENS, S. J.; LEWIS, G. P. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista* and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 163, n. 1/2, p. 93-105, 1989.

RAN, Y.; HAMMETT, K. R. W.; MURRAY, B. G. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amarylidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 87, n. 6, p. 823-830, June 2001.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 69, n. 1, p. 63-71, 2001.

SHAN, F.; YAN, G.; PLUMMER, J. A. Karyotype evolution in the genus *Boronia* (Rutaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 142, n. 3, p. 309-320, July 2003.

SMARDA, P. et al. Ploidy level variability of some Central European fescues (*Festuca* subg. *festuca*, Poaceae). **Biologia**, Brastilava, v. 60, n. 1, p. 25-36, 2005.

SMARDA, P.; KOČI, K. Chromosome number variability in Central European members of the *Festuca ovina* and *F. pallens* groups (sec. *Festuca*). **Folia Geobotanica**, Praha, v. 38, n. 1, p. 65-95, Mar. 2003.

SOLADOYE, M. O. et al. Morphometric study of the genus *Senna* Mill. in Southwestern Nigeria. **African Journal of Plant Science**, Pretoria, v. 4, n. 3, p. 44-52, Mar. 2010.

SOUZA, M. G.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 144, n. 2, p. 181-191, Feb. 2004.

SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB023149>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

STACE, C. A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **Taxon**, Utrecht, v. 49, n. 3, p. 451-477, Aug. 2000.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. London: Unwin Human, 1990. 434 p.

TONA, L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fraction from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 93, n. 1, p. 27-32, July 2004.

TRIPATHI, V.; GOSWAMI, S. Generic relationship among *Cassia* L., *Senna* Mill. and *Chamaecrista* Moench using RAPD markers. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, Victoria, v. 3, n. 3, p. 92-100, Mar. 2011.

TUCKER, S. C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 911-926, Mar. 2003.

\_\_\_\_\_. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia sensu stricto*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae): a study in convergence. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 6, p. 687-711, June 1996.

URDAMPILLETA, J. D. et al. Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 149, p. 451-455, 2005.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics: higher level systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003. p. 5-35.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGO**

**ARTIGO**

**Evolução cariotípica em espécies de *Senna* Mill.  
(Leguminosae-Cassiinae) de Minas Gerais**

## RESUMO

*Senna* Mill. é um dos gêneros com o maior número de espécies, cerca de 300, da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae), as quais possuem grande potencial medicinal, ornamental, madeireiro e para recuperação de áreas degradadas. A variabilidade cariotípica descrita na literatura aponta para o potencial das informações citogenéticas para estudos citotaxonômicos. Objetivou-se caracterizar o núcleo interfásico, o número e a morfometria dos cromossomos e a quantidade de DNA genômico de 11 espécies de *Senna*. Sementes dos acessos de *S. rugosa* foram avaliadas para verificar a ocorrência de poliembrionia. Houve variabilidade interespecífica no gênero *Senna* com relação ao tipo de núcleo interfásico, sendo encontrados núcleos arreticulados e semi-reticulados; ao número cromossômico ( $2n = 24, 26, 28$  e  $56$ ); à morfologia cromossômica (meta e submetacêntricos); tamanho de genoma ( $0,95$  a  $2,63$  pg/2C) e comprimento total do lote haplóide ( $23,91$  a  $58,21$   $\mu\text{m}$ ). Os cariótipos foram predominantemente simétricos. Observou-se variação cromossômica numérica entre células meristemáticas de um mesmo indivíduo para as espécies *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* e *S. splendida splendida*. Os mecanismos de poliploidia e disploidia estão envolvidos na evolução cariotípica do gênero *Senna*. *S. rugosa* é uma espécie apomítica facultativa, com variabilidade interpopulacional para grau de expressão da apomixia. Apesar da descrição de variação interespecífica para várias características do cariótipo, as informações citogenéticas não forneceram subsídios conclusivos para inferências citotaxonômicas. Dessa forma, fica evidente a necessidade de se fazer estudos mais aprofundados a respeito da organização dos cromossomos dessas espécies, por meio de bandeamento cromossômico e citogenética molecular, bem como ampliação do número de taxa em análise.

Palavras-chave: Apomixia. Caesalpinioideae. Citogenética. Conteúdo de DNA. Disploidia. Número cromossômico.

## ABSTRACT

*Senna* Mill. is one of the largest genera within subfamily Caesalpinioideae (Leguminosae), with about 300 species. It shows great potential for medicinal, ornamental, wood and restoration purposes. The karyotypic variability described in literature indicates cytogenetics as a valuable tool for cytotaxonomic studies. The aim of this work was characterizing interphasic nucleus and chromosome complement, with respect to the number and the morphology of chromosomes, and determine the amount of genomic DNA of 11 *Senna* species. Seeds of accessions of *S. rugosa* were evaluated to check the occurrence of polyembryony. There is interspecific variability in *Senna* for type of nucleus (non reticulated and semi-reticulated); for chromosome number ( $2n = 24, 26, 28$  and  $56$ ) and morphology (metacentric and submetacentric); for genome size ( $0.95$  to  $2.63$  pg/2C) and length of haploid complement ( $23.91$  to  $58.21$   $\mu\text{m}$ ). Karyotypes were predominantly symmetrical. Chromosome number variation among meristematic cells from the same individual was observed for the species *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* and *S. splendida splendida*. The mechanisms of polyploidy and disploidy are involved in the karyotypic evolution of this genus. *S. rugosa* is a facultative apomitic species, with interpopulation variability for the degree of expression of apomixis. Despite the description of interspecific variation for all evaluated characteristics, cytogenetic information did not provide conclusive subsidies to cytotaxonomic inferences. Thus, it is important to do further research about the organization of the chromosomes of these species, by chromosome banding and molecular cytogenetics, as well as to increase the number of taxa in the analysis.

Keywords: Apomixis. Caesalpinioideae. Cytogenetics. Chromosome number. Dyploidy. DNA content.

## 1 INTRODUÇÃO

*Senna* Mill. é um dos gêneros com o maior número de espécies, cerca de 300, pertencente à subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae Juss.) (DOYLE; LUCKOW, 2003; LEWIS, 2005). No Brasil, este gênero é composto por 80 espécies, 4 subespécies e 55 variedades (SOUZA; BORTOLUZZI, 2012). Muitas dessas espécies são arbustos que ocorrem em campos e como pioneiras em florestas em formação, principalmente em suas margens, sendo também comuns em beiras de estrada (Biondo et al. 2005c), possuindo grande potencial medicinal (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; EVANS; BANSI; SAMUE, 2002; LORENZI; ABREU, 2002; SAMY; IGNACIMUTS, 2001; TONA et al., 2004), ornamental, madeireiro e para recuperação de áreas degradadas (ARATO; MARTINS; FERRARI, 2003).

*Senna* Mill., juntamente com os gêneros *Cassia* L. sensu stricto e *Chamaecrista* Moench compõe a subtribo Cassiinae, da tribo Cassieae (LEWIS, 2005). Estudos feitos com proteínas de sementes (GUAREEB; KHALIFA; FAWZI, 1999), caracteres morfológicos, vegetativos e reprodutivos (DULBERGER; SMITH; BAWA, 1994; GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1988; IRWIN; BARNEBY, 1981, 1982; OWENS; LEWIS, 1989), características ontogenéticas (TUCKER, 1996), sequências de DNA cloroplastídico (gene *rbcL*, intron *trnL* e *trnL-F spacer*), marcadores moleculares do tipo RAPD, ISSR e AFLP (ACHARYA; MUKHERJEE; PANDA, 2011; BRUNEAU et al., 2001; DOYLE et al., 2000; HERENDENN; BRUNEAU; LEWIS, 2003a, 2003b; KAJITA et al., 2001; TRIPATHI; GOSWAMI, 2011) e citogenética (BIONDO et al., 2005; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, 2005b; GOLDBLATT, 1981) corroboram a divisão de Cassiinae nestes três gêneros distintos. Atualmente, a subtribo Cassiinae tem sido considerada monofilética (LEWIS, 2005), no entanto, Acharya, Mukherjee e

Panda (2011) consideram que a filogenia da subtribo Cassiinae necessita ser melhor trabalhada com um maior número de espécies.

A partir das relações filogenéticas dentro do gênero *Senna*, baseadas em análises de sequências de DNA de regiões cloroplastídicas foi possível reconhecer a monofilia apenas da seção *Psilorhegma*, enquanto *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia* foram consideradas parafiléticas, e *Astroites* e *Paradyction* estavam dentro de dois dos sete maiores clados identificados por essa filogenia molecular (MARAZZI et al., 2006).

Em *Senna*, já foi mostrado a existência de variabilidade cariotípica com potencial para estudos citotaxonômicos. Com relação aos números cromossômicos, foram relatados  $2n = 24, 26, 28$  e  $56$ , com prevalência de  $2n = 28$  (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, 2005b; FERREIRA et al., 2010; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Esses números sugerem a importância da poliploidia e da disploidia na história evolutiva do gênero, que provavelmente tem  $x=14$  como número básico derivado. Essas hipóteses precisam de verificação com uma amostragem mais ampla do número de espécies e da distribuição geográfica para o entendimento mais conclusivo das tendências de evolução cromossômica no gênero (BIONDO et al., 2005).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o núcleo interfásico e o complemento cromossômico, com relação ao número e a morfometria dos cromossomos, e determinar a quantidade de DNA de 11 espécies de *Senna* de Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Botânico

Exsicatas do material botânico listado na Tabela 1 foram depositadas no Herbário ESAL, da Universidade Federal de Lavras. Duplicatas deste material foram enviadas ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), onde foram identificadas pelo Dr. Haroldo Cavalcante de Lima. Com relação às plantas coletadas das espécies de *Senna*, o número de acessos corresponde ao número de localidades, sendo coletada uma planta por localidade.

### 2.2 Análise citogenética

Para germinação das sementes das 11 espécies de *Senna* foi necessária quebra de dormência com escarificação química com ácido sulfúrico. Foram realizados testes com ácido sulfúrico em diferentes concentrações (100%, 80% e 60%) e tempos de exposição (2 a 20 min.), sendo selecionada a concentração de ácido sulfúrico a 100%, com tempo de exposição de 20 min. para *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa*, *S. splendida splendida*, *S. cernua*, *S. occidentalis*, *S. corymbosa*, *S. pendula*, *S. spectabilis* e *S. alata*, enquanto que para *S. multijuga* foi de 8 min., e de 2 min para *S. siamea* e *S. silvestris bifária*, seguida de lavagem em água corrente por 5 min.

Tabela 1 Espécies do gênero *Senna* Mill. de Minas Gerais (Leguminosae-Cassiinae) com suas respectivas origens de coleta, número de acessos coletadas (NA) e número de registro no Herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras.

ESPÉCIE	ORIGEM	NA	ESAL
<b>SEÇÃO CHAMAEFISTULA</b>			
<b>Série Bacillares</b>			
<i>Senna macranthera</i> (Collad.) I. & B. var. <i>macranthera</i> (Collad.) I. & B.	Lavras	5	20.423
<i>Senna rugosa</i> (G. Don) I. & B.	Lavras	5	20.422
<i>Senna splendida</i> (Vog.) I. & B. var. <i>splendida</i> (Vog.) I. & B.	Lavras	3	20.425
<b>Série Basiglandulosae</b>			
<i>Senna cernua</i> (Balbis) I. & B.	São João del-Rei	5	20.970
<b>Série Coluteoideae</b>			
<i>Senna corymbosa</i> (Lam.) I. & B.	Lavras	1	22.069
<i>Senna pendula</i> (Willd.) I. & B.	Lavras	3	20.463
<b>Série Floridae</b>			
<i>Senna siamea</i> (Lam.) I. & B.	Lavras	1	20.465
<b>Série Sapindifoliae</b>			
<i>Senna silvestris</i> (Vell.) I. & B. var. <i>bifaria</i> I. & B.	Lavras	5	20.429
<b>SEÇÃO PEIRANISIA</b>			
<b>Série Excelsae</b>			
<i>Senna spectabilis</i> (DC.) I. & B.	Lavras	3	20.462
<b>Série Interglandulosae</b>			
<i>Senna multijuga</i> (L.C. Rich.) I. & B.	Lavras	5	20.466
<b>SEÇÃO SENNA</b>			
<b>Série Pictae</b>			
<i>Senna alata</i> (L.) Roxburgh	Perdões	3	22.065

Para obtenção dos cromossomos mitóticos, as sementes, após escarificação, foram colocadas para germinar em câmara úmida, sob temperatura controlada de 28 a 30 °C. As raízes com cerca de 5-8 mm foram coletadas e submetidas a tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína, com concentração, tempo de exposição e temperatura previamente testados. Foi utilizada a solução de 8-hidroxiquinoleína a 2mM, a 30°C, com o tempo de exposição variando para cada espécie, sendo de: 1:30 a 1:45 h para *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa*, *S. splendida splendida* e *S. pendula*; e 3:30 a 4:00 h para *S. cernua*, *S. corymbosa*, *S. spectabilis*, *S. alata*, *S. multijuga*, *S. siamea* e *S. silvestris bifaria*. Após o tratamento, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético) gelado e mantidas a -20 °C.

Após a lavagem das pontas de raízes para retirada do fixador, as mesmas foram colocadas em solução enzimática de pectinase e celulase (100/200 U), a 37°C, com tempo de exposição variando de 10 a 20 min, para digestão da parede celular. As lâminas foram montadas em ácido acético 45%, pelo método de esmagamento sob lamínula e a retirada da lamínula foi feita com nitrogênio líquido.

As lâminas foram secas ao ar e coradas com Giemsa 10% por 5 minutos, lavadas em água destilada e secas em placa aquecedora. A análise foi feita em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

Para os acessos de cada espécie de *Senna* foram selecionadas, no mínimo, 15 metáfases para contagem dos cromossomos. De duas a quatro metáfases foram usadas para a obtenção das medidas do braço curto (s) e longo (l) dos cromossomos, utilizando o programa Image Tool 3.0. A partir das medidas dos braços foram calculados: comprimento total do cromossomo i ( $C_{ti} = l + s$ ); comprimento total do lote haplóide ( $CTLH = \sum C_{ti}$ ); relação de braços

( $RB = l/c$ ) e índice centromérico ( $IC = c/Cti \times 100$ ). A morfologia cromossômica foi determinada a partir dos valores de RB e IC, conforme Guerra (1986).

Para comparação das espécies com relação aos valores de CTLH foi feita análise de variância e teste de Scott-Knot (5%).

A classificação da estrutura do núcleo interfásico (1.000 núcleos analisados por acesso) seguiu a nomenclatura proposta por Guerra (1985).

Os índices obtidos foram também usados para construir o idiograma e o cariograma das espécies, bem como determinar a assimetria cariotípica de acordo com Stebbins (1958) e Zarco (1986).

### **2.3 Quantificação de DNA através da citometria de fluxo**

Para cada espécie de *Senna* foi realizado um *bulk* de coleta de tecido foliar dos acessos para preparação de três amostras para a determinação do conteúdo de DNA, com exceção dos acessos de *S. rugosa*, para os quais foram avaliadas três amostras por acesso. Para cada amostra foram utilizadas de 20 a 30 mg de folhas jovens das espécies de *Senna* e de *Pisum sativum*, que foi utilizada como padrão interno de referência. As amostras foram trituradas em placa de Petri contendo 1mL de tampão gelado Marie, para a obtenção da suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). O tecido triturado foi aspirado por meio de duas camadas de gaze com uma pipeta plástica e filtrado em uma malha de náilon de 50 $\mu$ m. Em cada amostra foram adicionados 25 $\mu$ L de iodeto de propídeo (1mg/mL) e 2,5 $\mu$ L de RNase.

A análise de pelo menos 10.000 núcleos por amostra foi realizada no citômetro FacsCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); os histogramas foram obtidos no software Cell Quest (Becton Dickinson e Companhia, San Jose, CA, USA) e analisados no software WinMDI 2.8.

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado por meio de

comparação com a posição do pico G1 do padrão interno de referência (*Pisum sativum*) usando a relação  $Q = (E/S) \times R$ , em que Q é a quantidade de DNA da amostra (pg/2C), E é a posição do pico G1 da amostra, S é a posição do pico G1 do padrão de referência e R é o conteúdo de DNA do padrão (9,09 pg/2C).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **2.4 Análise da ocorrência de poliembrionia nos acessos de *S. rugosa***

As sementes dos cinco acessos de *S. rugosa* (LE; LVR; MEX; SER e VR), após escarificação, foram colocadas para germinar em câmara úmida, sob temperatura controlada de 28 a 30 °C. Foram avaliadas de 80 a 200 sementes por acesso para verificar o número de plântulas emitidas por semente. Foi adotada para a análise do delineamento inteiramente casualizado o modelo generalizado binomial. Os preditores lineares das médias de genótipos foram comparados utilizando o teste t de Student. As análises foram feitas no R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

### **3 RESULTADOS**

Para as espécies de *Senna* a maioria dos núcleos interfásicos foi caracterizada como arreticulados, com fina granulação e intensa coloração da cromatina difusa (Fig. 1A e 1B), com exceção de *S. multijuga*, a qual apresentou núcleo interfásico semi-reticulado (Fig. 1C). Foi possível distinguir dois subtipos de núcleos interfásicos arreticulados, sendo um típico, com cromocentros pontualmente delimitados (Fig. 1A) e outro sem cromocentros evidenciados (Fig. 1B), em *S. silvestris bifaria* e *S. alata*.

Varição intraespecífica para tipo de núcleo interfásico foi detectada para os acessos de *S. rugosa*, sendo que o acesso VR apresentou núcleo interfásico semi-reticulado, com intensa coloração da cromatina difusa (Fig. 1D), enquanto os demais apresentaram núcleo arreticulado com fina granulação e fraca coloração da cromatina difusa (Fig. 1E).

O comportamento de condensação cromossômica das espécies avaliadas mostrou-se homogêneo, com condensação tardia das porções distais dos cromossomos (Fig. 1F).

Os números cromossômicos encontrados foram  $2n = 24, 26, 28$  e  $56$  (Tab. 2, Fig. 1F-K, Fig. 1N), sendo  $2n = 28$  o mais freqüente.

Não foi verificada variação cromossômica numérica entre os acessos de nenhuma das espécies avaliadas, no entanto foi verificada variação numérica dentro de indivíduos em *S. multijuga* ( $2n = 24$ ) (Fig. 1F), *S. pendula* ( $2n = 28$ ), *S. macranthera macranthera* ( $2n = 26$ ) (Fig. 1G) e *S. splendida splendida* ( $2n = 26$ ) (Fig. 1H) e *S. rugosa* ( $2n = 56$ ) (Fig. 1N). Para *S. multijuga* e *S. pendula* a ocorrência de células com o dobro do número cromossômico mais freqüente foi de cerca de 1 em cada 10 a 15 células avaliadas (7 a 10%), enquanto que para *S. macranthera macranthera* e *S. splendida splendida* (Fig. 1L), foi de cerca de 1 em cada 3 a 5 células (20 a 33%).

A maior variação cromossômica numérica entre células ( $2n = 28$  a  $2n = 112$ ) foi observada nos cinco acessos de *S. rugosa* (Tab. 3). No entanto, em todos os acessos, a maior freqüência foi de células com  $2n = 56$  (Fig. 1N), com apenas um acesso possuindo células com  $2n = 28$  (Fig. 1M) e outro com  $2n = 112$  (Fig. 1O) cromossomos (Tab. 3).

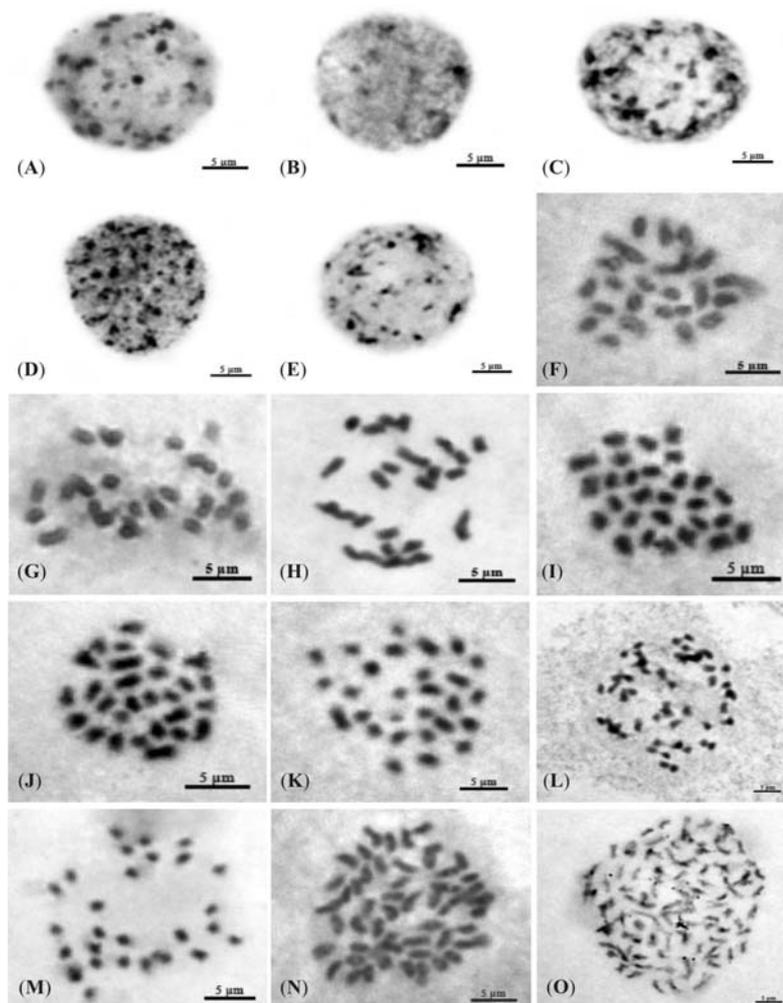


Figura 1 Tipo de núcleos interfásicos e números cromossomos mitóticos de *Senna* Mill. *S. pendula*: núcleo arreticulado com cromocentros delimitados (A). *S. alata*: núcleo arreticulado com poucos cromocentros (B). *S. multijuga*: núcleo semi-reticulado (C). Acessos de *S. rugosa*: núcleo semi-reticulado (D) e arreticulado (E). Metáfases de *S. multijuga* ( $2n = 24$ ) (F); de *S. macranthera macranthera* (G) e de *S. splendida splendida* (H) ( $2n = 26$ ); de *S. cernua* (I), *S. corymbosa* (J) e *S. silvestris bifaria* (K) ( $2n=28$ ); e de *S. macranthera macranthera* ( $2n = 52$ ) (L). Metáfase dos acessos de *S. rugosa* com  $2n = 28$  (M),  $2n = 56$  (N) e  $2n = 112$  (O) cromossomos.

Tabela 2 Número cromossômico (2n) de 11 taxa pertencentes a três Seções de *Senna* Mill. de Minas Gerais.

Taxa	2n	Determinações prévias		Referências
		n	2n	
<b>SEÇÃO</b>				
<b>CHAMAEFISTULA</b>				
<b>Série Baccilares</b>				
<i>S.macranthera macranthera</i>	26	13	24, 26	Irwin e Turner (1960); Federov (1969); Biondo et al. (2005, 2005b); Ferreira (2009)
<i>S. rugosa</i>	56*	14, 28	-	Biondo (2005); Ferreira (2009)
<i>S. splendida</i>	26*	13	-	Biondo (2005); Ferreira (2009)
<b>Série Basiglandulosae</b>				
<i>S. cernua</i>	28*	14	-	Biondo et al. (2005); Ferreira (2009)
<b>Série Coluteoideae</b>				
<i>S. corymbosa</i>	28	14	28	Irwin e Turner (1960); Federov (1969); Biondo et al. (2005, 2005b); Ferreira (2009)
<i>S. pendula</i>	28*	14	-	Biondo et al. (2005); Ferreira (2009)
<b>Série Floridae</b>				
<i>S. siamea</i>	28	14	28	Ohri et al. (1986); Yeh et al. (1986); Choudhary e Choudhary (1988, 1989); Datta, Mandal e Bhattacharya (1992); Souza e Benko-Iseppon (2004); Ferreira (2009)
<b>Série Sapindifoliae</b>				
<i>S. silvestris bifaria</i>	28	14	28	Souza e Benko-Iseppon (2004); Ferreira (2009)

Continuação

Taxa	2n	Determinações prévias		
		n	2n	Referências
<b>SEÇÃO PEIRANISIA</b>				
<b>Série Excelsae</b>				
<i>S. spectabilis</i>	28*	14	-	Ferreira (2009)
<b>Série Interglandulosae</b>				
<i>S. multijuga</i>	24	12, 16	16, 24	Irwin e Turner (1960); Federov (1969); Bandel (1974); Coleman e De Menezes (1980); Gill e Husaini (1985); Biondo et al. (2005, 2005ab); Ferreira (2009)
<b>SEÇÃO SENNA</b>				
<b>Série Pictae</b>				
<i>S. alata</i>	28	14	24, 28	Irwin e Turner (1960); Federov (1969); Gill e Husaini (1981); Sanjappa e Dasgupta (1981); Gill e Husaini (1985); Yeh et al. (1986); Alves e Custódio (1989); Kumari e Bir (1989); Souza e Benko-Iseppon (2004); Biondo et al. (2005b); Ferreira (2009)

\* Primeiro relato de números cromossômicos mitóticos.

Tabela 3 Variação no número cromossômico, quantidade de DNA nuclear (pg) e ocorrência de poliembrião entre os acessos de *Senna rugosa* (G. Don) Irwin & Barneby. NT = número total de células avaliadas.

Acessos	Porcentagem de células observadas com diferentes números cromossômicos												NT	DNA <sup>1</sup> pg/2C	Poliembrião <sup>2</sup> %
	28	36	42	44	46	48	50	52	54	56	84	112			
MEX	11	5	16	-	5	11	5	11	11	21	5	-	38	2,80a	19,1a
LVR	-	12	9	9	3	9	9	12	9	25	3	-	40	2,61b	35,6b
LE	-	-	10	5	5	-	5	25	-	40	5	5	23	2,58b	45,5c
VR	-	15	20	5	10	15	-	-	-	25	10	-	29	2,58b	61,5c
SER	-	-	-	-	11	6	17	17	-	43	6	-	18	2,57b	50,0c

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste t de Student, a 5% de probabilidade.

Para oito das onze espécies *Senna* estudadas foi realizada uma descrição cariotípica mais detalhada (Tab. 4, Fig. 2, Fig. 3). A maioria das espécies apresentou cromossomos metacêntricos a submetacêntricos, com diminuição gradual de tamanho ou tamanhos similares. Em *S. pendula* (Fig. 2C) e *S. alata* (Fig. 2G) foi possível observar um par de cromossomos com Região Organizadora do Nucléolo (RON), formando constrições secundárias, nos braços longos dos cromossomos, com satélites medindo 1,27  $\mu\text{m}$  e 0,52  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Com relação à média dos comprimentos cromossômicos, os menores valores foram observados em *S. macranthera* (1,84  $\mu\text{m}$ ) e *S. siamea* (1,87  $\mu\text{m}$ ) e os maiores em *S. multijuga* (2,29  $\mu\text{m}$ ) e *S. pendula* (2,19  $\mu\text{m}$ ).

Os índices de assimetria quanto à posição do centrômero (A1) e ao tamanho dos cromossomos (A2) variaram, respectivamente, de 0,11 a 0,31 e 0,15 a 0,34 (Tab. 4), revelando cariótipos predominantemente simétricos, mas com variação interespecífica. No entanto, não houve formação clara de grupos no gráfico de dispersão dos índices (Fig. 4). Apenas para a Seção *Chamaefistula* foi possível observar uma tendência mais clara de simetria com relação ao tamanho e com variação na morfologia, com exceção de *S. pendula* que apresentou ambos os índices com valores relativamente altos.

A classificação segundo Stebbins (1958) também aponta para maior simetria dos cariótipos (Tab. 4). *S. siamea* e as três espécies da Série Baccilares da Seção *Chaemafistula* (*S. macranthera*, *S. rugosa* e *S. splendida*) foram agrupadas na categoria 1a (inexistência de cromossomos com razão de braços (BL/BC) maior que 2 e razão entre o maior e o menor cromossomo, menor que 2). As demais espécies de *Senna* foram classificadas na Categoria 1b (razão entre o maior e o menor cromossomo entre 2 e 4).

Tabela 4 Morfometria cromossômica de 11 taxa pertencentes a três Seções de *Senna* Mill. de Minas Gerais. Comprimento total do cromossomo (Ct); fórmula cariotípica (FC); comprimento total do lote haplóide (CTLH); quantidade de DNA (pg/2C); índice de assimetria intracromossômica (A<sub>1</sub>); índice de assimetria intercromossômica (A<sub>2</sub>); assimetria cariotípica de Stebbins (St.); ma = média aritmética e s<sub>m</sub>= desvio padrão da média em µm; sm: submetacêntrico e m: metacêntrico.

Taxa	2n	Ct		FC	CTLH <sup>1</sup>	DNA <sup>1</sup>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	St.
		Intervalo	ma ± s <sub>m</sub>						
<b>Série Bacillares</b>									
<i>S. macranthera macranthera</i>	26	2,67-1,32	1,84±0,37	2sm+11m	23,91e	1,44c	0,23	0,2	1a
<i>S. rugosa</i>	56	3,03-1,40	2,08±0,39	28m	58,21a	2,63a	0,17	0,19	1a
<i>S. splendida splendida</i>	26	2,43-1,44	2,1±0,31	5sm+8m	27,58c	1,58b	0,3	0,15	1a
<b>Série Basiglandulosae</b>									
<i>S. cernua</i>	28	-	-	-	-	1,09e	-	-	-
<b>Série Coluteoideae</b>									
<i>S. corymbosa</i>	28	-	-	-	-	1,59b	-	-	-
<i>S. pendula</i>	28	3,91-1,27	2,19±0,76	5sm+9m	30,72b	1,51b	0,31	0,34	1b
<b>Série Floridae</b>									
<i>S. siamea</i>	28	2,51-1,48	1,87±0,32	14m	26,24d	1,04e	0,11	0,17	1a
<b>Série Sapindifoliae</b>									
<i>S. silvestris bifaria</i>	28	-	-	-	-	1,07e	-	-	-
<b>Série Excelsae</b>									
<i>S. spectabilis</i>	28	2,82-1,26	2,02±0,43	7sm+7m	28,27c	1,57b	0,31	0,21	1b
<b>Série Interglandulosae</b>									
<i>S. multijuga</i>	24	4,01-1,52	2,29±0,78	1sm+11m	27,43d	1,22d	0,21	0,34	1b
<b>Série Pictae</b>									
<i>S. alata</i>	28	2,56-1,15	1,77±0,41	1sm+13m	24,77d	0,95e	0,18	0,23	1b

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

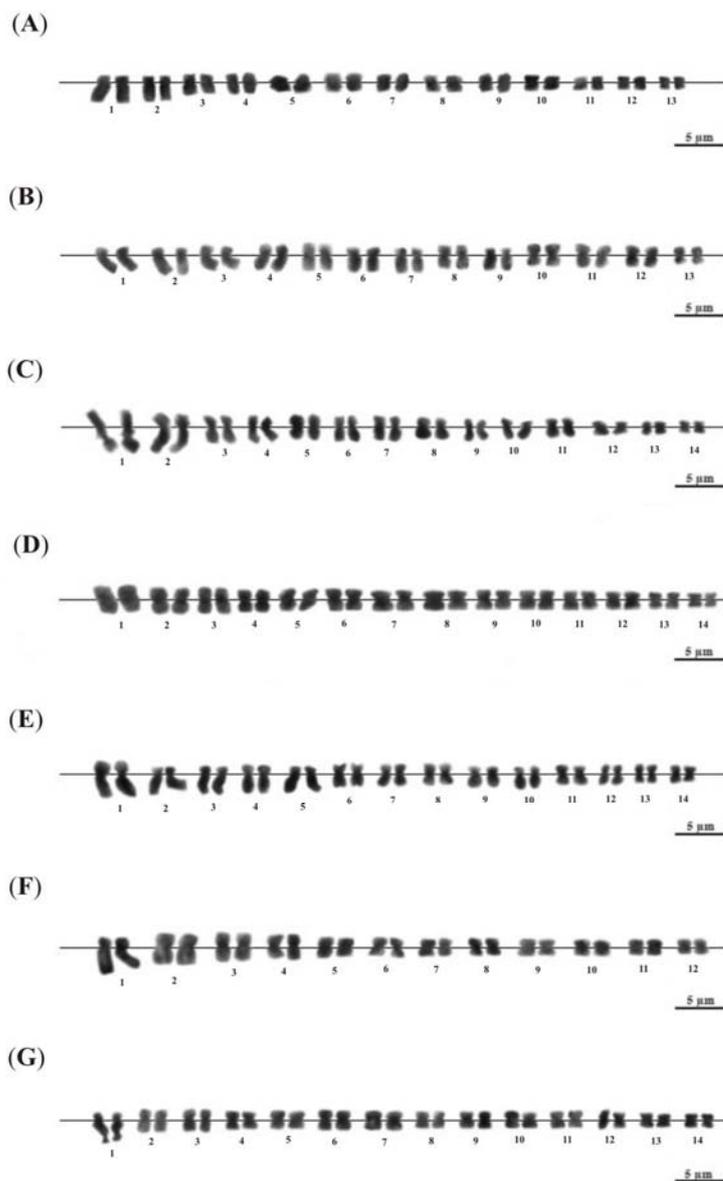


Figura 2 Cariogramas de espécies de *Senna* Mill. *S. macranthera macranthera* (A). *S. splendida splendida* (B). *S. pendula* (C). *S. siamea* (D). *S. spectabilis* (E). *S. multijuga* (F). *S. alata* (G).

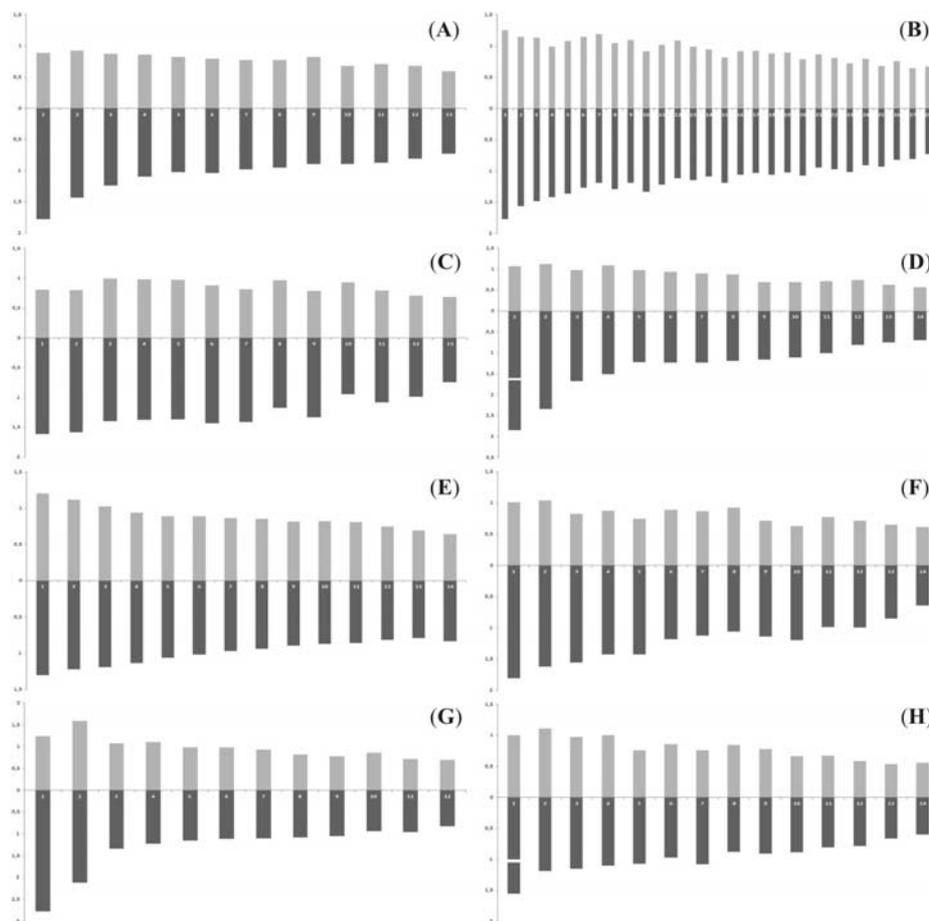


Figura 3 Idiogramas do complemento haploide das espécies de *Senna* Mill. Seção *Chamaefistula*: Série Baccilares – *S. macranthera macranthera* (A), *S. rugosa* (B) e *S. splendida splendida* (C); Série Coluteoideae: *S. pendula* (D); Série Floridae: *S. siamea* (E). Seção *Peiranisia*: Série Excelsae – *S. spectabilis* (F); Série Interglandulosae – *S. multijuga* (G). Seção *Senna*: Série Pictae – *S. alata* (H). Escala em  $\mu\text{m}$ .

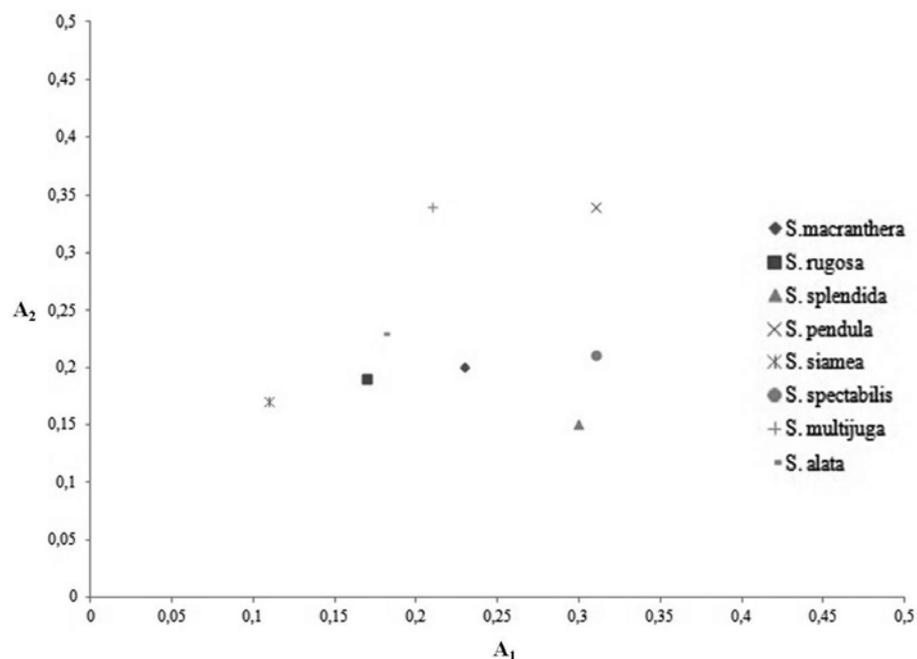


Figura 4 Diagrama de dispersão mostrando a assimetria cariotípica das espécies de *Senna* Mill., segundo Zarco (1986).

Para as espécies de *Senna* com valores de comprimento total do lote haploide (CTLH) calculados, *S. rugosa* apresentou o maior valor (58,21  $\mu\text{m}$ ) enquanto que *S. macranthera* apresentou o menor valor (23,91  $\mu\text{m}$ ) (Tab. 4).

A análise dos núcleos interfásicos por citometria de fluxo para estimativa da quantidade de DNA genômico das espécies de *Senna* apresentou excelente qualidade, com formação de histogramas com picos bem definidos e baixo ruído (Figura 5). Essa qualidade é confirmada pelo baixo coeficiente de variação (CV), que variou de 0,44 a 0,82. *S. rugosa* foi a espécie com maior conteúdo de DNA estimado (2,63 pg/2C), enquanto *S. alata* apresentou o menor valor (0,95 pg/2C) (Tab. 4).

Houve variabilidade da quantidade de DNA para os cinco acessos de *S. rugosa*, com a formação de dois grupos estatisticamente distintos, sendo um

composto somente pelo MEX, o qual apresentou a maior quantidade de DNA, e o segundo, pelos demais acessos (Tab. 3).

Todos os acessos de *S. rugosa* apresentaram emissão de mais de um embrião por semente, com o número variando de 2 a 4 (Fig. 6), havendo diferença significativa na frequência de poliembrionia entre os acessos (Tab. 3).

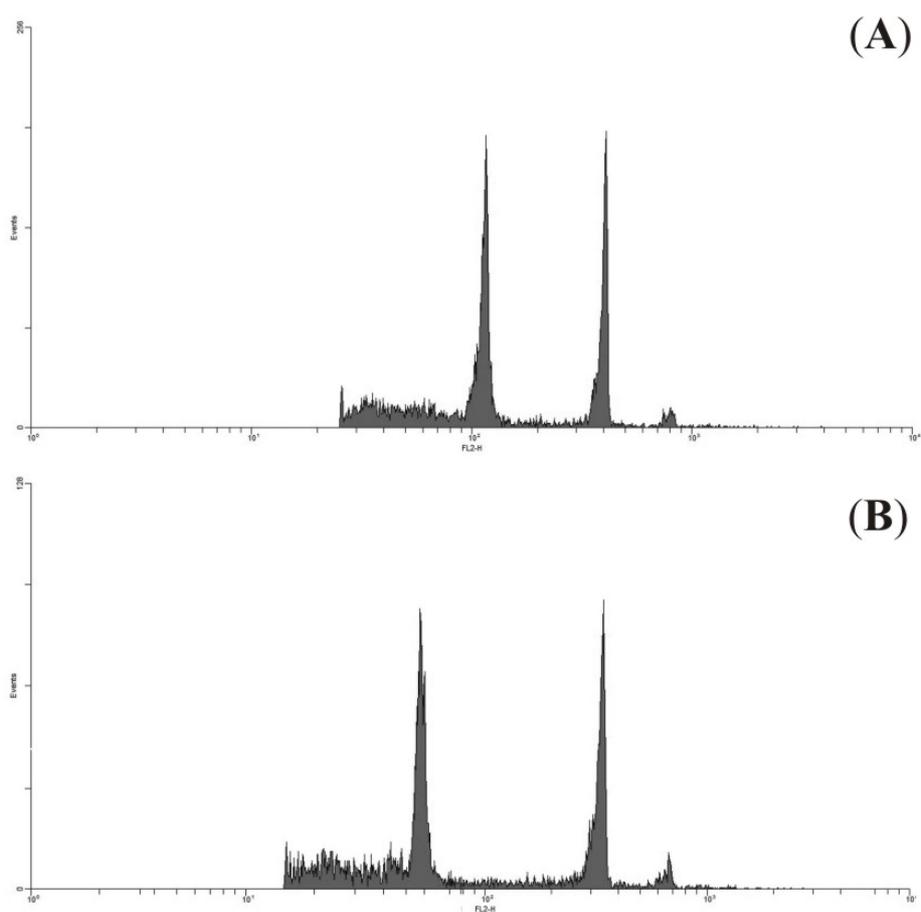


Figura 5 Histograma de citometria de fluxo em núcleos do acesso MEX de *Senna rugosa* (A) e de *Senna alata* (B). O primeiro pico em cada histograma é referente ao Pico G1 de cada uma das espécies de *Senna* e, o segundo, ao Pico G1 da amostra do padrão interno de referência (*Pisum sativum*).



Figura 6 Ocorrência de múltiplas plântulas por semente de cinco acessos de *Senna rugosa*. Duas plântulas por semente: MEX (A), LVR (B), LE (C) e VR (D). Três plântulas por semente: VR (E). Quatro plântulas por semente: SER (F). Régua milimetrada.

#### 4 DISCUSSÃO

Na subfamília Caesalpinioideae algumas particularidades na organização do núcleo interfásico podem ser identificadas, quando se realiza a coloração convencional com Giemsa. Em *Senna* esse núcleo foi classificado como semi-reticulado, sendo polarizados, com fina granulação e intensa coloração da cromatina difusa, com apenas a espécie *S. quinquangulata* mostrando mais granulação e cromocentros delimitados (SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004).

Nos resultados do presente trabalho não foi observada tal polarização, sendo que apenas o acesso VR de *S. rugosa* teve núcleo interfásico caracterizado como o de *S. quinquangulata*. A maioria dos núcleos observados mostrou

classificação semelhante à espécie *S. occidentalis* descrita por Ferreira et al., (2010), sendo do tipo arreticulado.

Os números cromossômicos relatados para *S. macranthera macranthera*, *S. splendida splendida*, *S. cernua*, *S. corymbosa*, *S. pendula* e *S. multijuga* corroboram os dados obtidos por Biondo et al. (2005), e para *S. spectabilis*, obtido por Ferreira (2009), em células meióticas. Os números cromossômicos relatados para *S. siamea*, *S. silvestris bifaria* e *S. alata* corroboram os dados obtidos por Biondo, Miotto e Schifino-Wittmann (2005b), Matos et al. (2010) e Souza e Benko-Iseppon (2004), em células mitóticas (Tab. 2).

A variação cromossômica numérica entre células meristemáticas de ponta de raiz de um mesmo indivíduo observada em *S. multijuga*, *S. pendula*; *S. macranthera macranthera* e *S. splendida splendida* e *S. rugosa* não foi relatada na literatura anteriormente para este gênero. No entanto, células com o dobro de número cromossômico em indivíduos considerados diplóides também foram relatadas por Alejandra e Bernardello (2005) em análises cariotípicas de três espécies argentinas de *Caesalpinia* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae), com  $2n = 24$  cromossomos. Estes autores observaram cerca de 30% de células tetraplóides ( $2n = 48$ ) de um total de 30 a 40 células avaliadas de *C. gilliesii*; enquanto que para *C. mimosifolia* este valor foi de 12% de um total de 60 células avaliadas e, de 50% de um total de 50 células, para *C. paraguariensis*.

Para a espécie *S. rugosa*, Ferreira (2009) também encontrou variação cromossômica numérica, entretanto, relatando células somente com  $n = 14$  e  $n = 28$  cromossomos. Coleman e Demenezes (1980) encontraram  $n = 14$  para acessos do estado de São Paulo e Biondo et al. (2005) identificaram um acesso tetraplóide ( $n = 28$ ), no estado do Paraná. Segundo Ferreira (2009), a identificação de números cromossômicos diplóides e tetraplóides, associada à

observação de quadrivalentes em acessos de *S. rugosa*, indica a existência de raças cromossômicas com diferentes níveis de ploidia.

O presente estudo da morfometria cromossômica das espécies de *Senna* confirmou a tendência descrita na literatura de que os cromossomos são pequenos, com cerca de 2  $\mu\text{m}$ , semelhantes, com predominância de cromossomos metacêntricos e com condensação tardia das porções distais dos cromossomos (BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005a, 2005b; FERREIRA et al., 2010; MATOS et al., 2010; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004). Uma comparação direta entre as descrições cariotípicas apresentadas com dados da literatura foi possível para *S. alata*, a qual teve seu cariótipo apresentado por Souza e Benko-Iseppon (2004), sendo demonstrado similaridade quanto ao tamanho cromossômico e à fórmula cariotípica, além do fato de que esta espécie apresentou cromossomos satelitados, com a diferença de que estes autores, às vezes, encontravam dois pares de cromossomos com satélites.

A condensação tardia das porções distais dos cromossomos foi um complicador da obtenção de metáfases com boa morfologia cromossômica para montagem dos cariótipos, sendo o principal motivo da inviabilidade de uma descrição cariotípica detalhada para a espécie *S. cernua*.

Os valores de CTLH tiveram uma boa concordância com os de quantidade de DNA nuclear, com exceção da espécie *S. macranthera*, a qual apresentou quantidade de DNA mediana e o menor valor de CTLH. Isso se deve, provavelmente, ao maior grau de condensação das metáfases de *S. macranthera*.

A natureza poliploide de *S. rugosa* foi demonstrada pela predominância de células com  $2n=56$  cromossomos e valor C claramente superior às demais em uma magnitude multiplicativa. No entanto, com os resultados obtidos no presente trabalho, não foi possível confirmar a hipótese sugerida por Biondo et al. (2005) e Ferreira (2009) de autopoliploidia para esta espécie, uma vez que

não foi encontrado um provável ancestral diplóide, ou que pelo menos tenha a maioria de suas células com  $2n = 28$  cromossomos.

Os dados de quantidade de DNA e de número cromossômico, no presente trabalho, evidenciam o mecanismo de disploidia envolvido na evolução do gênero *Senna*, já que espécies com diferentes números cromossômicos foram significativamente semelhantes quanto à quantidade de DNA. Observando as tendências de simetria cariotípica das espécies de *Senna* (Fig. 4), provavelmente também ocorreram alterações estruturais, de tal maneira que houve modificações na posição dos centrômeros, sendo possível observar um aumento na quantidade de DNA e no comprimento dos cromossomos, juntamente com um aumento no grau de assimetria cariotípica. Alguns autores (KUMARI; BIR, 1989; SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004; STEBBINS, 1971) também relataram que o fato de algumas espécies possuírem pequenos cromossomos com cariótipos relativamente simétricos, tais como *S. alata* e *S. siamea* ( $2n = 28$ ) e *S. rugosa* ( $2n = 56$ ) pode estar relacionado à ancestralidade.

A maioria das espécies analisadas no presente trabalho apresentou  $2n = 28$  cromossomos, com somente as espécies da Série Baccilares (Seção *Chamaefistula*) apresentando números cromossômicos diferentes, sendo encontrado  $2n = 26$  e a prevalência de células com  $2n = 56$  em *S. rugosa*, e *S. multijga* com  $2n = 24$  pertencente à Série Interglandulosae (Seção *Peiranisia*).

Destaca-se a observação de células com o dobro de cromossomos nas espécies das Séries Interglandulosae, Coluteoideae e, principalmente, entre as espécies da Série Baccilares, como a *S. rugosa*, a qual apresentou uma grande variação cromossômica numérica, enfatizando a importância da poliploidia na evolução do gênero *Senna*.

As características compartilhadas entre as espécies da Série Baccilares, *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* e *S. splendida splendida*, tais como variação cromossômica numérica, cariótipos simétricos com predominância de

cromossomos metacêntricos e semelhança da morfologia floral, entre outras, corroboram a estreita relação filogenética observada por Marazzi et al. (2006), onde essas espécies foram agrupadas num mesmo clado.

Essa abordagem citotaxonômica de espécies de *Senna* foi realizada por Biondo et al. (2005) em 17 espécies das Séries Baccilares, Basiglandulosae, Coluteoideae, Trigonelloideae (Seção *Chamaefistula*) e da Série Interglandulosae (Seção *Peiranisia*), sendo encontrado a predominância de  $n = 14$  cromossomos. Para as espécies da Série Baccilares estes autores encontraram  $n = 13$  para *S. angulata*, *S. macranthera* e *S. splendida*, e  $n = 28$  para *S. rugosa*. Duas das espécies analisadas da Série Trigonella apresentaram números cromossômicos diferentes,  $n = 13$  em *S. obtusifolia* e  $n=11$  em *S. pilífera*, e a única espécie examinada da Série Interglandulosae, *S.multijuga*, tinha  $n = 12$  cromossomos. Os autores sugerem que  $x = 14$  seja o número básico, provavelmente um número básico derivado, sendo os demais números evidências de disploidia, com  $n=11$  sendo o valor final da série dispoloide observada entre as espécies estudadas.

Almada, Daviña e Seijo (2006) realizaram análises cariotípicas e estudaram a evolução cromossômica de oito espécies sul americanas de *Crotalaria* (Leguminosae – Faboideae), sendo encontrado  $x = 8$  cromossomos, com exceção de *C. incana* a qual apresentou  $x = 7$ . A maioria dos gêneros relatados na tribo Crotalarieae têm  $x = 9$  (GOLDBLATT, 1981), desta maneira, estes autores relataram que  $x = 8$  poderia ter sido derivado a partir de um ancestral com  $x = 9$  e, como um evento evolutivo subsequente, o  $x = 7$  poderia ter se originado de  $x = 8$ .

Os mecanismos de redução cromossômica por aneuploidia (VERMA et al., 1984; OLIVEIRA; AGUIAR-PERECIN, 1999) e disploidia (CHENNAVEERAIHAH; PATIL, 1973) têm sido propostos para explicar esta variação no número básico de *Crotalaria*. Segundo Greilhuber e Ehrendorfer

(1988) mudanças de números cromossômicos em cariótipos com cromossomos monocêntricos poderia requerer uma redução no número de centrômeros com perda significativa de segmentos cromossômicos codantes. Assim, a disploidia pode ser o mecanismo mais provável envolvido na redução do número cromossômico básico de *Crotalaria*, já que o conteúdo de DNA observado para *C. incana* ( $x = 7$ ) foi similar ao de espécies com  $x = 8$  cromossomos.

A observação de diferentes números cromossômicos nos cinco acessos de *S. rugosa* associada à descrição de Ferreira (2009) de irregularidades no pareamento cromossômico, baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis e a variação de caracteres morfológicos encontrada, sugerem a ocorrência de apomixia em *S. rugosa*.

A ocorrência de múltiplas plântulas por semente nos acessos de *S. rugosa* (Fig. 6), podem sugerir que o tipo de mecanismo envolvido na apomixia desta espécie é a embrionia adventícia, relatada por Carneiro e Dusi (2002), principalmente encontrada em plantas tropicais e subtropicais.

Características como a poliploidia, determinada por análise citogenética ou citometria de fluxo (CARMAN, 1997); distúrbios na meiose (QUARIN, 1980; VALLE; GLIENKE; LEGUIZAMON, 1994) e grau variável de aborto e esterilidade do grão de pólen (ASKER; e JERLING, 1992) são típicas de espécies apomíticas. Em muitas espécies a apomixia está associada à poliembrionia (ASKER; JERLING, 1992), compreendendo um tipo de reprodução assexual, na qual a semente é formada sem que ocorra fecundação (CRUZ; FEDERIZZI; MILACH, 1998).

A poliembrionia em sementes de *Cassia* foi primeiramente relatada por Braun (1859), quando o gênero incluía os atuais *Cassia* sensu stricto, *Chamaecrista* e *Senna*. Symon (1956) relatou que a poliembrionia ocorreu em amostras de sementes de espécies da seção *Psilorhegma* (atualmente pertencente ao gênero *Senna*), da série *Subverrucosae*, endêmica da Austrália.

Randell (1970) realizou estudos visando verificar as adaptações do sistema genético de espécies de *Cassia* na zona árida australiana. Os testes de germinação de sementes realizados confirmaram a ocorrência de poliembrião em oito taxa desta série *Subverrucosae*, sendo relatado que esta característica parecia ser restrita às espécies australianas endêmicas, as quais continham altos níveis e frequências de poliploidia.

Embriões assexuais foram estudados por Randell (1970), no material citado acima, sendo observado que o desenvolvimento dos embriões apomíticos se iniciou antes dos embriões sexuais. Essa diferença no desenvolvimento dos embriões foi presenciada no presente trabalho, já que as múltiplas plântulas por semente apresentavam estágios distintos de maturação. Este autor também relata que os embriões assexuais parecem não sobreviver sem o início da formação do endosperma e todos os óvulos que não foram penetrados pelo tubo polínico degeneraram, considerando, portanto, esta apomixia como pseudogâmica.

Holman e Playford (2000) avaliaram a variabilidade morfológica e molecular de espécies australianas do complexo *Senna artemisioides*, considerada uma espécie apomítica facultativa pseudogâmica por Randell (1970). As diferenças genéticas fixadas encontradas por Holman e Playford (2000) indicaram a falta de fluxo gênico entre os morfotipos e ausência de hibridação entre eles. Estes autores sugeriram que os morfotipos distintos geneticamente são linhagens independentes originadas de um evento reprodutivo sexual ancestral, o qual foi perpetuado pela reprodução apomítica.

Os aspectos da evolução cariotípica de *Senna*, considerando os 11 taxa pertencentes às três seções ocorrentes em Minas Gerais, de um total de 39 espécies descritas no Estado (SOUZA; BORTOLUZZI, 2012), confirmam a tendência evolutiva descrita por Biondo et al. (2005). Apesar da descrição de variação interespecífica para várias características do cariótipo, as informações citogenéticas não forneceram subsídios conclusivos para inferências

citotaxonômicas. Dessa forma, fica evidente a necessidade de se fazer estudos mais aprofundados a respeito da organização dos cromossomos dessas espécies, por meio de bandeamento cromossômico e citogenética molecular, bem como ampliação do número de taxa em análise. Destaca-se os resultados em *S. rugosa*, a qual reúne um conjunto de características (poliploidia, apomixia, variação no número cromossômico em células meristemáticas) que evidenciam maior variabilidade genômica sob seleção quando comparada com as demais espécies.

## 5 CONCLUSÕES

Os mecanismos de poliploidia e disploidia estão envolvidos na evolução cariotípica do gênero *Senna*.

*Senna rugosa* é uma espécie apomítica facultativa, com variabilidade interpopulacional para grau de expressão da apomixia.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K.; PANDA, P. C. Separation of the genera in the subtribe Cassiinae (Leguminosae: Caesalpinioideae) using molecular markers. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 223-233, Jan./Feb. 2011.

ALEJANDRA, C. M.; BERNARDELLO, G. Karyotype analysis in Argentinean species of *Caesalpinia* (Leguminosae). **Caryologia**, v. 58, n. 3, p. 262-268, 2005.

ALMADA, R. D.; DAVIÑA, J. R.; SEIJO, G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southern most South American species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.150, n.3, p.329-341, Mar. 2006.

ALVES, M. A. O.; CUSTÓDIO, A. V. C. Citogenética de Leguminosas coletadas no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Genética**, v. 12, p. 81-92, 1989.

ARATO, H. D.; MARTINS, S. V.; FERRARI, S. H. S. Produção e decomposição de serapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 5, p. 715-721, set./out. 2003.

ASKER, S.; JERLING, L. **Apomixis in plants**. Boca Raton: CRC, 1992. 298 p.

BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Fabaceae. **Caryologia**, Tokyo, v. 27, n. 1, p. 17-32, 1974.

BIONDO, E. et al. Cytogenetics and cytotaxonomy of brazilian species of *Senna* Mill. (Cassieae – Caesalpinioideae - Leguminosae). **Caryologia**, Tokyo, v. 58, n. 2, p. 152-163, Apr./June 2005.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília caesalpinioideae: leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248, 2005a.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 797-808, out./dez. 2005b.

BRAUN, A. Uber polyembryonie and keimung von *Caelobogyne*. **Abhandlungen Akademie Physikalischen**, Berlin, n. 170, p. 107-263, 1859.

BRUNEAU, A. et al. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**, New York, v. 3, n. 26, p. 487-514, July/Sept. 2001.

CARMAN, J. G. Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 61, n. 1, p. 51-94, May 1997.

CARNEIRO, V. T. C.; DUSI, D. M. A. Apomixia: em busca de tecnologias de clonagem de plantas por sementes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 25, p. 36-42, mar. 2002.

CHENNAVEERAIHAH, M. S.; PATIL, B. C. Chromosome number and karyotype study in eight species of *Crotalaria*. **Cytologia**, v. 38, p. 73-79, 1973.

COLEMAN, J. R.; DEMENEZES, E. M. Chromosome numbers in Leguminosae from the state of São Paulo, Brazil. **Rhodora**, Cambridge, v. 82, p. 475-474, 1980.

CRUZ, R. P.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. A apomixia no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 155-161, jan./fev. 1998.

DATTA, B. K.; MANDAL, S.; BHATTACHARYA, G. N. Biosystematic study of some leguminous taxa. **Cell and Chromosome Research**, v. 15, p. 8, 1992.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, Sept. 1997.

DOYLE, J. J. et al. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P. S.; BRUENAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. p. 1-20.

DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, n. 3, p. 900-910, Mar. 2003.

DULBERGER, R.; SMITH, M. B.; BAWA, K. S. The stigmatic orifice in *Cassia*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Caesalpinaceae): morphological variation, function during pollination, and possible adaptive significance. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 11, p. 1390-1396, Nov. 1994.

EVANS, C. E.; BANSI, A.; SAMUE, O. A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi* in vitro study. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 80, n. 1, p. 21-24, Apr. 2002.

FEDEROV, A. A. **Chromosome numbers of flowering plants**. Leningrad: Russian Academy of Sciences. 1969. 926p.

FERREIRA, K. **Citogenética e palinologia das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae (FABACEAE) do sul de Minas Gerais**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FERREIRA, K. et al. Karyotype, meiotic behavior and pollen features of *Senna occidentalis*. **Biologia**, Berlin, v. 65, n. 5, p. 789-795, Sept. 2010.

GALBANY-CASALS, M.; SUSANNA, A.; BRIONES, J. M. Low base numbers and dysploidy in annual *Helichrysum* Mill. (Asteraceae: Gnaphalieae). **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Krakow, v. 51, n. 2, p. 107-114, Dec. 2009.

GILL, L. S.; HUSAINI, S. W. H. Cytology of some arborescent Papilionoideae (Fabaceae) of southern Nigeria. **Boletim da Sociedade Broteriana (Series 2)**, v. 58, p. 187-200. 1985.

GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981. p. 427-463.

GOTTSBERGER, G.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Evolution of flower structures and pollination in neotropical Cassiinae (Caesalpinaceae) species. **Phyton**, Horn, v. 28, n. 2, p. 293-320, 1988.

GREILHUBER J.; EHRENDORFER F. Karyological approaches to plant taxonomy. **ISI Atlas of Sciences: Plants and Animals**, v. 1, p. 289–297, 1988.

GUAREEB, A.; KHALIFA, S. F.; FAWZI, N. Molecular systematics of some *Cassia* species. **Cytologia**, Florence, v. 64, n. 1, p. 11-16, 1999.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 120, n. 3/4, p. 339-350, May 2008.

GUERRA, M. S. Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: COLÓQUIO SOBRE CITOGENÉTICA E EVOLUÇÃO DE PLANTAS, 1., 1985, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Genética, 1985. p. 137-153.

\_\_\_\_\_. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 741-743, 1986.

HERENDEEN, P. S.; BRUNEAU, A.; LEWIS, G. P. Floral morphology in caesalpinoid legumes: testing the monophyly of the 'Umtiza clade'. **International Journal of Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. S393-S407, 2003a. Supplement.

\_\_\_\_\_. Phylogenetic relationships in Caesalpinoid legumes: a preliminary analysis based on morphological and molecular data. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics: higher level systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2003b. p. 37-62.

CHOU DHARY, P.; Choudhary, S. S. Karyotypic studies and trend of speciation in some species of Caesalpinaceae. **Journal of Cytology and Genetics**, v. 23, p. 183–189, 1988.

\_\_\_\_\_. Meiotic studies for determination of taxonomic relatedness in some taxa of the Caesalpinaceae (Fabaceae). **La Kromosomo II**, v. 54, p. 1787–1792, 1989.

HOLMAN, J. E.; PLAYFORD, J. Molecular and morphological variation in the *Senna artemisioides* complex. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 48, n. 5, p. 569-579, 2000.

IRWIN, H. S.; BARNEBY, R. C. American Cassiinae: a synoptical revision Leguminosae, Tribe Cassieae, subtribe Cassiinae in New World. **Memorial New York Botanical Garden**, New York, v. 35, n. 1/2, p. 1-918, 1982.

\_\_\_\_\_. *Cassieae*. In: POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 97-106.

IRWIN, H. S.; TURNER, B. L. Chromosomal relationships and taxonomic considerations in the genus *Cassia*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 47, n. 4, p. 309-318, Apr. 1960.

KAJITA, T. et al. *RbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. **Systematic Botanic**, New York, v. 23, n. 3, p. 515-536, July/Sept. 2001.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 10, p. 1425-1437, Oct. 1993.

KOLTUNOW, A. M.; BICKNELL, R. A.; CHAUDHURY, A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 4, p. 1345-1352, Aug. 1995.

KUMARI, S.; BIR, S. S. Karyomorphological evolution in Caesalpinaceae. **Journal of Cytology and Genetics**, Bangalore, v. 24, n. 2, p. 149-163, 1989.

LAKSHMANAN, K. K.; AMBEGAOKAR, K. B. Polyembryony. In: JOHRI, B. M. (Ed.). **Embryology of angiosperms**. Berlin: Springer Verlag, 1984. p. 445-474.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LEWIS, G. P. Cassieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.). **Legumes of the world**. London: Royal Botanic Gardens Kew, 2005. p. 111-125.

LORENZI, H.; ABREU, F. J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

MARAZZI, B. et al. Phylogenetic relationships within *Senna* (Leguminosae, Cassiinae) based on three chloroplast DNA regions: patterns in the evolution of floral symmetry and extrafloral nectarines. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 93, n. 2, p. 288-303, 2006.

MATOS, L. P. de et al. Citogenética e citotaxonomia de gênero *Senna* Mill. (Leguminosae) com ênfase nas espécies ocorrentes na Bahia. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA, 14., 2010, Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2010. 1 CD-ROM.

NAGL, W.; EHRENDORFER, F. DNA content, heterochromatin, mitotic index and growth in perennial and annual Anthemidea (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 123, p. 35-54, 1974.

OHRI, D.; KUMAR, A.; PAL, M. Correlations between 2C DNA values in habit in *Cassia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 153, p.223-227, 1986.

OLIVEIRA, A. L. P. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tokyo, v.64, n.2, p.164-174, 1999.

OWENS, S. J.; LEWIS, G. P. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species of *Cassia*, *Chamaecrista* and *Senna* (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 163, n. 1/2, p. 93-105, 1989.

QUARIN, C. L. et al. A rise of ploidy level induces the expression of apomixis in *Paspalum notatum*. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 13, n. 5, p. 243-249, May 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

RANDELL, B. R. Adaptations in the genetic system of Australian arid zone *Cassia* species (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 18, n. 1, p. 77-97, 1970.

- SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 69, n. 1, p. 63-71, 2001.
- SANJAPPA, M.; DASGUPTA, A. Chromosome number reports LXXI. **Taxon**, v. 30, p. 508-509, 1981.
- SOUZA, M. G.; BENKO-ISEPPON, A. M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 144, n. 2, p. 181-191, Feb. 2004.
- SOUZA, V. C.; BORTOLUZZI, R. L. C. *Senna*. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB023149>>. Acesso em: 15 fev. 2012.
- STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnold, 1971. 216 p.
- \_\_\_\_\_. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, New York, v. 23, p. 365-378, Jan. 1958.
- SYMON, D. E. Polyembryony in *Cassia*. **Nature**, London, v. 177, p. 177-179, 1956.
- TONA, L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fraction from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal Ethnopharmacology**, Clare, v. 93, n. 1, p. 27-32, July 2004.
- TRIPATHI, V.; GOSWAMI, S. Generic relationship among *Cassia* L., *Senna* Mill. and *Chamaecrista* Moench using RAPD markers. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, Victoria, v. 3, n. 3, p. 92-100, Mar. 2011.
- TUCKER, S. C. Trends in evolution of floral ontogeny in *Cassia sensu stricto*, *Senna*, and *Chamaecrista* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae: Cassiinae): a study in convergence. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 83, n. 6, p. 687-711, June 1996.

VALLE, C. B.; GLIENKE, C.; LEGUIZAMON, G. O. C. Inheritance of apomixis in *Brachiaria*, a tropical forage grass. **Apomixis Newsletter**, Paris, v. 7, n. 1, p. 42-43, 1994.

VERMA, R.C.; KESAVACHARYULU, K.; RAINA, S.N. Cytogenetics of *Crotalaria* IX: mitotic complements in 19 species. **Cytologia**, Tokyo, v.49, n.1, p.157-169, 1984.

YEH, M. S.; YUASA, H.; MAEKAWA, F. Chromosome numbers in the Fabaceae. **Science Reports of the Research Institute, Evolutionary Biology**, v. 3, p. 57-71, 1986.

ZARCO, C. R. A new method for estimating karyotype asymetry. **Taxonomy**, London, v. 35, n. 3, p. 526-530, 1986.