

**CITOGENÉTICA E PALINOLOGIA DAS
SUBFAMÍLAS CAESALPINIOIDEAE E
FABOIDEAE (FABACEAE) DO SUL DE
MINAS GERAIS**

KÁTIA FERREIRA

2009

KÁTIA FERREIRA

**CITOGÉNÉTICA E PALINOLOGIA DAS SUBFAMÍLAS
CAESALPINIOIDEAE E FABOIDEAE (FABACEAE) DO SUL DE
MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Giovana Augusta Torres

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Ferreira, Kátia.

Citogenética e palinologia das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae (FABACEAE) do sul de Minas Gerais / Kátia Ferreira. – Lavras : UFLA, 2009.

112 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Giovana Augusta Torres

Bibliografia.

1. *Senna*. 2. *Crotalaria*. 3. Citogenética. 4. Meiose. 5. Viabilidade do grão de pólen. 6. Palinologia. I. Universidade Federal De Lavras. II. Título.

CDD – 583.322

KÁTIA FERREIRA

**CITOGÉNÉTICA E PALINOLOGIA DAS SUBFAMÍLAS
CAESALPINIOIDEAE E FABOIDEAE (FABACEAE) DO SUL DE
MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2009

Profa. Dra. Aparecida Célia Paula dos Santos

DCNAT/UFSJ

Prof. Dr. Mateus Mondin

ESALQ/USP

Profa. Dra. Giovana Augusta Torres
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

A Deus Pai, criador de todas as coisas

Ao Filho, Jesus Cristo, redentor

Ao Espírito Santo

e a todos irmãos e irmãs que compartilham

esta minha passagem pela Terra...

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Maria Etelvina e Sérgio, Míria e Ângelo, e às minhas queridas irmãs Rosane e Renata e a toda minha família, pelo apoio, amor incondicional e compreensão.

Em especial, ao Rodrigo, amor da minha vida, companheiro maravilhoso, e aos nossos filhotes Fofitcho e Docinho...

DEDICO

“Você não sabe
O quanto eu caminhei
Prá chegar até aqui
Percorri milhas e milhas
Antes de dormir
Eu nem cochilei
Os mais belos montes
Escalei
Nas noites escuras
De frio chorei...

A vida ensina
E o tempo traz o dom
Pra nascer uma dissertação
Com a fé do dia-a-dia
Encontro a solução
Encontro a solução...

Meu caminho só meu pai
Pode mudar
Meu caminho só meu pai
Meu caminho só meu pai...

Você não sabe
O quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui...

Meu caminho só meu Deus
Pode mudar
Meu caminho só meu Deus
Meu caminho...”

(Toni Garrido/Lazão/Da Gama/Bino Farias)

AGRADEÇO

À Fapemig, 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.

Ao professor Eduardo Alves e à amiga Eloísa, do Laboratório de Microscopia Eletrônica – UFLA, pelo auxílio e pela disposição na utilização da microscopia eletrônica.

Aos professores Magno, João Bosco, Elaine, José Eduardo, Samuel e Wagner, pelos ensinamentos no decorrer do mestrado.

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

Ao professor Mateus Mondin, por disponibilizar sua atenção e seu tempo como membro da banca avaliadora.

À minha querida Vovó Dalva, por acompanhar sempre e a todos os familiares (Tia Bel, Celinho, Davi, e “Família Marques”), 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.

Ao grande amigo Saulo Marçal de Souza, por ter me mostrado como a citogenética é linda, por todo trabalho que realizamos juntos e, principalmente, pelos grandes ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética da UFLA pelos momentos de aprendizado, alegria e amizade. Em especial, à amiga Isabelle Villela Carvalho por todo apoio, auxílio e incentivo.

BIOGRAFIA

Kátia Ferreira, filha de Sérgio Ferreira e Maria Etelvina da Silva Ferreira, nasceu em 9 de setembro de 1984, em Lavras, Minas Gerais.

Iniciou o curso de graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São João del-Rey em abril de 2003, licenciando-se em dezembro de 2006.

Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/UFSJ, de julho de 2005 a agosto de 2006, desenvolveu sua iniciação científica na área de Citogenética Vegetal, com o projeto "Citogenética de *Senna occidentalis* (L.) Link e *Senna obtusifolia* (L.) H. S. Irwin e Barneby", sob orientação da Profa. Dra. Aparecida Célia Paula dos Santos e sob co-orientação da Profa. Dra. Giovana Augusta Torres, em convênio com a Universidade Federal de Lavras.

Em março de 2006, iniciou o mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Federal de Lavras, concluindo-o em fevereiro de 2009, sob orientação da Profa. Dra. Giovana Augusta Torres.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
RESUMO GERAL.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1.....	
1 Introdução.....	1
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Aspectos de Sistemática e Evolução das Subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae.....	3
2.2 Aspectos Citogenéticos das Subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae.....	5
Referências bibliográficas.....	12
CAPÍTULO 2: Citologia da reprodução de espécies de <i>Senna</i> Mill. (Caesalpinioideae – Fabaceae) do sul de Minas Gerais.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	20
1 Introdução.....	21
2 Material e Métodos.....	22
2.1 Material botânico.....	22
2.2 Análise meiótica.....	24
2.3 Viabilidade do grão de pólen.....	24
2.3.1 Testes com corantes.....	24
2.3.2 Teste de germinação <i>in vitro</i>	26
3 Resultados e Discussão.....	26
4 Conclusão.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
CAPÍTULO 3: Comportamento meiótico anormal em espécies de <i>Crotalaria</i> L. (Faboideae-Fabaceae).....	43
Resumo.....	44
Abstract.....	45
1 Introdução.....	46
2 Material e Métodos.....	47
2.1 Material botânico.....	47
2.2 Análise meiótica.....	48
2.3 Viabilidade do grão de pólen.....	48
2.3.1 Testes com corantes.....	48

2.3.2 Teste de germinação <i>in vitro</i>	49
3 Resultados e Discussão.....	50
4 Conclusão.....	63
Referências Bibliográficas.....	64
CAPÍTULO 4: Palinologia de espécies das subfamílias Caesalpinioidea e Faboideae (Fabaceae).....	67
Resumo.....	68
Abstract.....	69
1 Introdução.....	70
2 Material e Métodos.....	73
2.1 Material botânico.....	73
2.2 Análises polínicas.....	73
3 Resultados e Discussão.....	77
4 Conclusão.....	104
Referências Bibliográficas.....	105
ANEXOS.....	109

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
CAPÍTULO 2	
Figura 1 – Meiose em espécies de <i>Senna</i> Mill.....	29
Figura 2 – Comportamento meiótico de <i>Senna rugosa</i>	30
Figura 3 – Meiose em espécies de <i>Senna</i> Mill.....	31
Figura 4 – Meiose em espécies de <i>Senna</i> Mill.....	33
Figura 5 – Viabilidade polínica em espécies de <i>Senna</i> Mill.....	35
CAPÍTULO 3	
Figura 1 – Meiose em espécies de <i>Crotalaria</i> L.....	52
Figura 2 – Diacineses das espécies de <i>Crotalaria</i> (n = 8).....	53
Figura 3 – Anormalidades meióticas em <i>Crotalaria zanzibarica</i> (n = 8).....	55
Figura 4 – Anormalidades meióticas em <i>Crotalaria micans</i> (n = 8).....	57
Figura 5 – Anormalidades meióticas em <i>Crotalaria spectabilis</i> (n = 8).....	59
Figura 6 – Viabilidade e germinação de grãos de pólen de <i>Crotalaria</i> ..	62
CAPÍTULO 4	
Figura 1 – Descrição polínica de <i>Peltophorum dubium</i>	80
Figura 2 – Descrição polínica de <i>Senna cernua</i>	85
Figura 3 – Descrição polínica de <i>Senna corymbosa</i>	86
Figura 4 – Descrição polínica de <i>Senna multijuga</i>	87
Figura 5 – Descrição polínica de <i>Senna alata</i>	88
Figura 6 – Descrição polínica de <i>Senna siamea</i>	89
Figura 7 – Descrição polínica de <i>Senna spectabilis</i>	90
Figura 8 – Descrição polínica de <i>Senna macranthera macranthera</i>	91
Figura 9 – Descrição polínica de <i>Senna rugosa</i>	92
Figura 10 – Descrição polínica de <i>Senna splendida splendida</i>	93
Figura 11 – Descrição polínica de <i>Cassia fistula</i>	94
Figura 12 – Descrição polínica de <i>Senna pendula</i>	95
Figura 13 – Descrição polínica de <i>Senna silvestres bifaria</i>	96

Figura 14 – Descrição polínica de <i>Crotalaria zanzibarica</i>	98
Figura 15 – Descrição polínica de <i>Crotalaria micans</i>	99
Figura 16 – Descrição polínica de <i>Crotalaria spectabilis</i>	100
Figura 17 – Árvore filogenética consenso stricto de espécies das subfamílias Faboideae e Caesalpinioideae, com base em caracteres palinológicos, utilizando o programa PAUP.....	102

LISTA DE TABELAS

	Páginas
CAPÍTULO 2	
Tabela 1 - Espécies do gênero <i>Senna</i> Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae) com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.....	23
Tabela 2 - Corantes e condições de diferentes testes de viabilidade de grão de pólen de espécies de <i>Senna</i> Mill.....	25
Tabela 3 - Número haploide de cromossomos (n); comportamento meiótico e índice meiótico (IM) de espécies do gênero <i>Senna</i> Mill.....	28
Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade polínica determinada por testes de coloração (VP %) e de germinação <i>in vitro</i> (G %) de espécies do gênero <i>Senna</i> Mill.....	34
CAPÍTULO 3	
Tabela 1 - Espécies do gênero <i>Crotalaria</i> L. (Fabaceae-Faboideae) com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.....	47
Tabela 2 - Corantes e condições de diferentes testes de viabilidade de grão de pólen de espécies de <i>Crotalaria</i> L.....	49
Tabela 3 - Distribuição da porcentagem de irregularidades por fases meióticas de três espécies do gênero <i>Crotalaria</i> L.....	54
Tabela 4 - Porcentagem de viabilidade polínica determinada por testes de coloração (VP %) e de germinação <i>in vitro</i> (G %) de três espécies do gênero <i>Crotalaria</i> L.....	61
CAPÍTULO 4	
Tabela 1 - Material botânico da família Fabaceae com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.....	76
Tabela 2 - Medidas (em μm) dos grãos de pólen em vista equatorial (n = 25). m = média aritmética; s_m = desvio padrão da média; P/E = relação entre a média do eixo polar e do eixo equatorial.....	78
Tabela 3 - Média (em μm) das medidas das camadas da exina dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioidea e Faboideae (n= 25) e ornamentação da exina.....	79

Tabela 4 - Média (em μm) das medidas dos colpos e das aberturas dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioideae e Faboideae (n= 25).....	81
Tabela 5 - Caracterização morfológica dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioideae e Faboideae. P = proeminente; NP = não-proeminente.....	82
Tabela 6 - Medidas (em μm) dos grãos de pólen em vista polar (n = 25). m = média aritmética; s_m = desvio padrão da média; índice de área polar (IAP = d/D).....	83

RESUMO GERAL

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

A família Fabaceae, terceira maior família de plantas com flores, com centros de diversidade nas regiões tropicais e subtropicais, é dividida em três grandes grupos: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. Faboideae, considerada monofilética, derivada de dentro da subfamília Caesalpinioideae, inclui o gênero *Crotalaria*, sendo este importante na indústria de papel e celulose, na agricultura em sistemas de rotação de culturas como fixadores de nitrogênio, na alimentação animal, no controle biológico de nematoides, na remoção de metais tóxicos e na ornamentação. Caesalpinioideae, considerada parafilética, inclui os gêneros *Peltophorum*, *Cassia sensu stricto* e *Senna*, com o último tendo grande potencial medicinal, ornamental, produção de madeira e recuperação de áreas degradadas. Os gêneros *Cassia sensu stricto*, *Senna* Mill. e *Chamaecrista* Moench. compõem o complexo gênero *Cassia sensu lato*. *Cassia s.l.* é considerado multibásico, tendo $x = 7$ como o número primário básico, responsável pelo estabelecimento do número básico secundário $x = 14$, do qual $x = 13$ e 12 derivaram por aneuploidização. Para o gênero *Crotalaria* têm sido propostos $x = 7$ e $x = 8$, sendo ainda polêmica a definição do número básico para o gênero. As relações filogenéticas que envolvem diferentes níveis taxonômicos da família Fabaceae ainda não são bem explicadas, necessitando de novos modelos baseados em informações adicionais às morfológicas e às moleculares. Descrição do número cromossômico, análise do comportamento meiótico, viabilidade do grão de pólen e palinologia foram realizados em espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae incidentes no Sul de Minas Gerais. Para o gênero *Senna*, a maioria das espécies analisadas apresentou comportamento meiótico regular, alto índice meiótico e elevada viabilidade do grão de pólen. O número básico do gênero *Senna* é discutido levando em conta a disploidia e a autopoliploidização no seu processo evolutivo. As espécies do gênero *Crotalaria* tiveram comportamento meiótico irregular, com anormalidades típicas em cada uma delas, resultando em baixa viabilidade dos grãos de pólen. Foi descrita variabilidade para características polínicas, as quais foram usadas para análise filogenética, que revelou falta de consistência no agrupamento do gênero *Senna*.

*Comitê Orientador: Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA (Orientadora);
Dra. Lisete Chamma Davide UFLA (Coorientadora).

ABSTRACT

FERREIRA, Kátia. **Cytogenetics and palinology of subfamilies Caesalpinioideae and Faboideae (FABACEAE) from south Minas Gerais State - Brazil.** 2009. 112p. Dissertation (Magister in Genetics and Plant Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, MG*.

Fabaceae, the third largest family of flowering plants, has its centers of diversity in tropical and subtropical regions and is divided in three major groups: Caesalpinioideae, Mimosoideae and Faboideae. Faboideae, considered as monophyletic and derived from subfamily Caesalpinioideae, includes the genus *Crotalaria*. This genus is important in industry of paper and cellulose, in agriculture as nitrogen fixer, as animal feed and as biological control of nematodes, in heavy metal bioremediation and in landscaping. Caesalpinioideae considered paraphyletic, includes the genera *Peltophorum*, *Cassia sensu stricto* and *Senna*. The last one have great potential for medicinal, ornamental, wood and degraded areas restoration. The genera *Cassia sensu stricto*, *Senna* Mill. and *Chamaecrista* Moench. make up the complex genus *Cassia sensu lato*. *Cassia s.l.* is considered multibasic, having $x=7$ as the primary basic chromosome number from which secondary basic number $x=14$ has been established. The basic numbers $x = 13$ and 12 might have evolved through aneuploidy reduction. It is controversial wheter $x= 7$ or $x= 8$ is the basic number of *Crotalaria* genus. The phylogenetic relationships in all taxonomic levels of Fabaceae family are not well explained yet, lacking new models based on information other than the morphologic ones. Description of chromosome number, meiotic behavior, pollen grain viability and morphology is showed for species of the subfamilies Caesalpinioideae and Faboideae from South Minas Gerais. Most of the *Senna* species showed regular meiotic behavior and high meiotic index and pollen grain viability. Basic number of the genus is discussed, taken in account disploidy and autopolyploidization along the evolution process of *Senna*. The *Crotalaria* species showed abnormal meiotic behavior, with typical abnormality for each species, resulting in low pollen grain viability. Pollen data showed variability useful for phylogenetic analysis. The consensus tree unrevealed low consistency in *Senna* grouping.

* Guidance Committee: Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA (Major Professor); Dra. Lisete Chamma Davide UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Fabaceae é a terceira maior família de plantas com flores, com, aproximadamente, 720 gêneros e mais de 18.000 espécies. Uma enorme diversidade de tipos de plantas, variando de herbáceas anuais a árvores, ocupa áreas que vão desde florestas chuvosas a desertos, e de terras baixas a habitats alpinos (Doyle & Luckow, 2003).

A família Fabaceae é dividida em três grandes grupos com base em caracteres morfológicos, particularmente nos florais (Tucker, 2003). Estes grupos, de tamanho desigual, são mais comumente reconhecidos como as subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Doyle & Luckow, 2003; Wojciechowski, 2003).

Faboideae é a maior subfamília com 30 tribos, 476 gêneros e, aproximadamente, 14 mil espécies, dentre as quais se encontram os feijões e o gênero *Crotalaria* (Lewis et al., 2005). O gênero *Crotalaria*, tribo Crotalarieae, possui aproximadamente 600 espécies (Polhill, 1982), das quais 31 são nativas do Brasil e 11 introduzidas (Flores, 2004). Este gênero é importante na indústria de papel e celulose, na agricultura em sistemas de rotação de culturas como fixadores de nitrogênio, na alimentação, no controle biológico de nematoides, na bioremediação de metais tóxicos e na ornamentação, entre outros (Medina, 1959; Polhill, 1982).

Mimosoideae, com 77 gêneros e por volta de 3 mil espécies, inclui grupos como o das acácias (Doyle & Luckow, 2003). Caesalpinioideae, bastante diversa, apresenta 162 gêneros, dentre os quais *Peltophorum*, *Cassia* e *Senna* e, aproximadamente, 3 mil espécies, a maioria tropical (Doyle & Luckow, 2003). Aproximadamente 80% das cerca de 260 espécies de *Senna* Mill. ocorrem em regiões neotropicais (Irwin & Barneby, 1982; Irwin & Barneby, 1981), com

grande potencial medicinal (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002; Evans et al., 2002; Lorenzi & Abreu, 2002; Samy & Ignacimuts, 2001; Tona et al., 2004), ornamental (Cavalcanti et al., 2003), para a produção de madeira e a recuperação de áreas degradadas (Arato et al., 2003).

Devido à enorme variação da família Fabaceae as relações filogenéticas de seus componentes ainda não são bem resolvidas, sendo necessários novos modelos baseados em informações adicionais às morfológicas (Wojciechowski, 2004). Nesse sentido, uma das alternativas é o uso de características citológicas, citogenéticas e palinológicas, as quais podem auxiliar no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução de um grupo, como também na delimitação de espécies.

No presente trabalho, serão descritos número cromossômico, comportamento meiótico, viabilidade do grão de pólen e palinologia de espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae incidentes no sul de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos de sistemática e evolução das subfamílias *Caesalpinioideae* e *Faboideae*

Nas análises filogenéticas moleculares, *Faboideae* e *Mimosoideae* parecem representar linhagens monofiléticas, significando que todos os descendentes dessas subfamílias compartilham um ancestral comum e exclusivo, no qual taxa não relacionados descendem de outro ancestral. (Doyle et al., 2000; Kajita et al., 2001; Wojciechowski, 2003). A terceira subfamília, *Caesalpinioideae*, entretanto, provavelmente é não-natural (parafilética), compreendendo uma diversa reunião de linhagens não relacionadas, a maioria divergindo relativamente cedo na história da família e não possuindo alguns aspectos florais distintivos que são usados para agrupar os gêneros dentro das outras duas subfamílias. Entre essas linhagens, a tribo *Cercideae* (*Caesalpinioideae*) foi a primeira a divergir na família, de acordo com dados moleculares (Doyle & Luckow, 2003).

A subfamília *Caesalpinioideae* é, usualmente, dividida em quatro ou cinco tribos: *Cercideae*, *Caesalpineae*, *Cassieae* e *Detarieae*, com *Macrolobieae* (derivada de *Detarieae*) recentemente incluída (Tucker, 2003).

Membros da tribo *Caesalpineae* são caracterizados por organização floral simples e falta de especialização dos componentes florais. Esses aspectos podem ser considerados plesiomórficos, ou seja, caracteres de estado ancestral (Tucker, 2003). Recentes análises filogenéticas moleculares (Bruneau et al., 2001; Doyle, 1995; Doyle et al., 2000;) e citogenéticas (Kumari & Bir, 1989; Souza & Benko-Iseppon, 2004; Stebbins, 1971) sugerem que esta tribo é não monofilética, devido aos caracteres plesiomórficos.

A tribo Cassieae é não monofilética, incluindo ao menos três linhagens separadas, de acordo com análises filogenéticas moleculares (Doyle et al., 2000; Doyle, 1995). A grande diversidade no desenvolvimento da forma floral, com muitas combinações de organogênese, suporta esta falta de relações entre membros da tribo Cassieae (Tucker, 2003).

O gênero *Cassia sensu lato*, nas caesalpinioideas da tribo Cassieae, foi dividido em três gêneros: *Cassia sensu stricto*, *Chamaecrista Moench* e *Senna* Mill, que foram reconhecidos com base nos caracteres de filamentos e na presença ou ausência de bractéolas (Irwin & Barneby 1982, 1981). Os três gêneros são superficialmente similares e mostram muitos caracteres especializados, tais como flores de cor amarela, corola pentâmera, heterostemonia dorsiventral e estame deiscente poricida. Muita atenção tem sido dada às investigações taxonômicas desses gêneros (Boonkerd et al., 2005). Estudos estão sendo feitos com proteínas de sementes (Guareeb et al., 1999), caracteres morfológicos, vegetativos e reprodutivos (Dulberger et al., 1994; Owens & Lewis, 1989; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988; Irwin & Barneby, 1982, 1981), características ontogenéticas (Tucker, 1996), sistemática molecular (Bruneau et al., 2001; Doyle et al., 2000;) e citogenética (Biondo et al., 2005abc; Goldblatt, 1981), e os resultados obtidos suportam a separação do gênero *Cassia*. Embora, ainda são encontrados trabalhos classificando espécies de *Senna* como *Cassia s.l.* Por meio de análises quantitativas de dados populacionais, pode se constatar que *Senna* é um táxon heterogêneo, enquanto *Cassia s.str.* e *Chamaecrista* são homogêneos, o qual é mais um forte motivo para evidenciar a separação entre *Senna* e *Cassia s.str.* (Boonkerd et al., 2005).

O gênero *Senna* Mill. é considerado parafilético e foi dividido em seis seções: *Psilorhegma*, *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia*, *Paradyction* e *Astroites*. *Astroites* (Irwin & Barneby, 1982; Irwin & Barneby, 1981). Suas espécies apresentam ampla variedade de habitats, mas a maioria das espécies é de árvores

ou arbustos que ocorrem em campos e, como pioneiras em florestas em formação e em florestas abertas, principalmente em suas margens, sendo também comuns em beiras de estrada e terras degradadas (Biondo et al., 2005c).

Análises moleculares (Doyle, 1995; Doyle et al., 2000; Kajita et al., 2001) e evidências morfológicas (Chappill, 1995) das leguminosas apresentam a subfamília Faboideae como um grupo monofilético, relacionado à Caesalpinioideae e sugerem que sua divergência das outras leguminosas ocorreu 45-50 milhões de anos atrás (Wojciechowski, 2003). Nesta subfamília, encontram-se os maiores grupos monofiléticos ou clados, como o clado genistoide, o qual inclui as tribos: Genisteae, Thermopsidae, Crotalariae, Podalyrieae e Sophoreae (Doyle et al., 2000; Polhill, 1981).

O gênero *Crotalaria* (tribo Crotalariae) é dividido em oito seções: *Grandiflorae*, *Crhysocalycicae*, *Hedriocarpae*, *Geniculatae*, *Calycinae*, *Crotalaria*, *Schizostigma* e *Dispermae* (Bisby, 1970; Bisby, 1973; Bisby & Polhill, 1973). As espécies pertencentes a este gênero necessitam de alta incidência de luz, sendo sensíveis a geadas e à aridez extrema, além de possuírem uma desvantagem competitiva em relação às gramíneas (Polhill, 1982). Espécies de *Crotalaria* encontram-se em ambientes abertos como cerrados e campos, podendo estar associadas a bordas de mata ciliar (Flores, 2004).

2.2 Aspectos citogenéticos das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae

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). De acordo com a via clássica de simetria para assimetria (Stebbins, 1971), seguida pelo aumento no tamanho dos cromossomos no mesmo nível de ploidia, as Caesalpinioideae são 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; Stebbins, 1971). Nas plantas superiores, a redução no tamanho dos cromossomos tem sido associada com a ocorrência de poliploidia, como observado em alguns grupos naturais (Sharma, 1970). Esta tendência não tem sido observada na tribo Cassieae; espécies de *Senna* e *Cassia* com o mesmo nível de ploidia têm tamanhos cromossômicos contrastantes (Souza & Benko-Iseppon, 2004).

De acordo com Souza & Benko-Iseppon (2004), os dados revelados por estudos sucessivos, mostraram que o gênero *Cassia s.l.* pode ser considerado um grupo multibásico, com $x = 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13$ e 14 (Irwin & Turner, 1960). A maioria dos autores considera $x = 7$ como o número primário básico para este grupo, responsável pelo estabelecimento do número básico secundário $x = 14$, do qual $x = 13$ e 12 pode ter evoluído por meio da diminuição por aneuploidia (Atchinson, 1951; George & Bhavanandan, 1993; Goldblatt, 1981; Irwin & Turner, 1960). Considera-se aneuploidia como uma mudança gradual do número de cromossomos de indivíduo para indivíduo, que tanto pode ser para mais como para menos, neste caso para menos, durante o processo evolucionário.

Dessa maneira, esta aneuploidia gerou como consequência uma disploidia, ou seja, diferentes números básicos para este mesmo gênero. A literatura demonstra a alta frequência de ocorrência de aneuploidia em *Cassia s.l.* em âmbito populacional (George & Bhavanandan, 1993; Irwin & Turner, 1960), confirmando a existência de citótipos distintos em populações naturais de algumas espécies (Goldblatt, 1981), como visto frequentemente na tribo Cassieae (Irwin & Turner, 1960).

Souza & Benko-Iseppon (2004) analisaram 13 espécies de Caesalpinioideae (os gêneros *Bauhinia*, *Caesalpinia*, *Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*) e Faboideae (*Bowdichia*, *Centrosema* and *Dioclea*) coletados de 17

populações naturais do Pará (Amazonas). Observações foram feitas na morfologia cromossômica, no tamanho, no comportamento de condensação e na estrutura do núcleo interfásico. 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. Diferenças significativas no tamanho cromossômico, morfologia e comportamento de condensação entre os membros analisados da tribo Cassieae (*Cassia*, *Chamaecrista* e *Senna*) revelaram que esta tribo é um grupo heterogêneo, do ponto de vista cariológico.

Dentro de 10 gêneros pertencentes às tribos Cassieae, Caesalpinieae e Cercideae, 74 acessos de 27 táxons foram analisados por Biondo et al. (2005b), quanto ao número de cromossomos. Os números encontrados foram $2n = 32, 28, 26, 24, 22, 16$ e 14 . Sete espécies tiveram seus números cromossômicos determinados pela primeira vez: *Cassia leptophylla*, *Senna araucarietorum*, *S. hilariana*, *S. neglecta*, *S. oblongifolia*, *Chamaecrista repens* e *Pomaria stipularis*. A maioria das espécies apresentou $2n = 28$ cromossomos, sendo observados também $2n = 26, 24$ e 22 . O gênero *Chamaecrista* diferenciou-se dos demais gêneros por apresentar $2n = 32, 16$ e 14 cromossomos, sendo o primeiro gênero com número supostamente originado por poliploidização. O número básico proposto para as espécies estudadas foi $x = 14$, com os demais números, $x = 13, 12$ e 11 , tendo surgido, provavelmente, por aneuploidia e, para o gênero *Chamaecrista*, foi de $x = 8$. A poliploidia parece ter sido importante na diversificação inicial do grupo, com ocorrência de uma série de reduções dispolides no decorrer do processo evolutivo. O caráter número de cromossomos mostrou-se relevante na distinção de táxons do gênero *Chamaecrista* dos demais gêneros, sugerindo, juntamente com outros caracteres analisados e encontrados

em literatura, a separação deste dos demais gêneros pertencentes à tribo Cassieae.

Segundo Biondo et al. (2005a), os números cromossômicos em espécies do gênero *Senna* são $2n = 22, 24, 26$ e 28 . O número básico para este gênero é aceito como $x = 14$, entretanto, considerado como uma ploidia derivada de $x = 7$ que é o número básico, como citado para o grupo *Cassia s.l.*, do qual *Senna* faz parte.

O gênero *Crotalaria* (tribo Crotalarieae) compreende uma maioria de espécies diploides (Mangotra & Koul, 1991; Oliveira & Aguiar-Perecin, 1999; Palomino & Vázquez, 1991). O número cromossômico da maioria das espécies de *Crotalaria* investigadas é $2n = 16$, com exceção de algumas que apresentam $2n = 14$, e outras que são poliploides ($2n = 32$) (Boulter et al., 1970; Oliveira & Aguiar-Perecin, 1999; Verma et al., 1984; Windler, 1974). Estudos cariotípicos têm encontrado que a diminuição do tamanho cromossômico está relacionado com o aumento da especialização floral (Boulter et al., 1970; Oliveira e Aguiar-Perecin, 1999), e estudos sobre a morfologia dos cromossomos têm revelado um grau elevado de simetria dos cariótipos, com algumas exceções na seção Chrysocalycinae (Almada et al., 2006; Oliveira e Aguiar-Perecin, 1999; Tapia-Pastrana et al., 2005). Em geral, as espécies poliploides apresentam cromossomos menores do que as espécies diploides do gênero, além do que, mostram efeito gigas para alguns órgãos e tecidos, sendo de grande importância na diversificação do grupo no continente Americano (Almada et al., 2006; Flores, 2004; Flores et al., 2006; Mangotra & Koul, 1991; Oliveira & Aguiar-Perecin, 1999; Windler, 1974).

Flores et al. (2006) contaram o número de cromossomos de 23 espécies de *Crotalaria* nativas do Brasil. O mais frequentemente encontrado foi $2n = 16$ e $2n = 32$. Somente *C. incana* L. tinha $2n = 14$ e *C. tweediana* Benth. tinha $2n = 54$. Os números cromossômicos $2n = 32$ e 54 foram encontrados em espécies da

seção *Calycinae* e $2n = 16$ e 14 em espécies da seção *Chrysocalycinae*. Esses dados revelam a importância de características cariotípicas na caracterização de seções dentro do gênero. Segundo estes autores os números cromossômicos $n = 8, 16, 7$ e 21 têm sido relatados, dos quais $n = 8$ e 7 são mais frequentes. A partir desses dados, tem sido proposto que o gênero seja dibásico, com $x = 7$ e $x = 8$.

Cariótipos de 18 populações de oito espécies de *Crotalaria* da América do Sul (Argentina) foram examinados por Almada et al. (2006). Todos tinham $x = 8$, exceto *C. incana* a qual tinha $x = 7$. Espécies diploides, tetraploides e octoploides foram encontradas. O octoplóide é o mais alto nível de ploidia detectado para este gênero. Do ponto de vista evolucionário, esses resultados apontam para uma diminuição no número básico de cromossomos do gênero por aneuploidia.

Segundo Mondin et al. (2007), esta discussão a respeito do número básico de cromossomos do gênero *Crotalaria* é desencadeada pelo registro de quatro espécies com $2n = 2x = 14$. A maior parte das espécies registradas é $2n = 2x = 16$, portanto, o número básico do gênero deveria ser $x = 8$. Mais recentemente, foi proposto, ainda, um número $x = 9$, baseado na descrição de uma única espécie *C. tweediana*, $2n = 6x = 54$ (Flores et al., 2006). Entretanto, esta mesma espécie foi também descrita com $2n = 8x = 64$, ou seja, um octaploide para $x = 8$ (Almada et al., 2006), sendo que a mesma poderia ser $2n = 7x - 2$ (Flores et al., 2006). Revisões sobre o número básico de cromossomos do gênero *Crotalaria* mostram que, das espécies descritas na literatura, 145 são $2n = 2x = 16$ e cerca de 13 são $2n = 4x = 32$, portanto, com origem em $x = 8$ (Mondin, 2003; Mondin et al., 2007; Morales, 2008).

Hipóteses foram propostas para explicar a origem do número cromossômico $x = 7$, tais como aneuploidia gerando disploidia. Uma explicação seria que o número básico de cromossomos pode ser reduzido por meio de translocações e perda de centrômeros sem perda significativa de material

genético, como visto na família Brassicaceae (Lysak et al., 2006; Stebbins, 1971). Esta hipótese foi seriamente considerada para explicar o número cromossômico de *Crotalaria incana* por Almada et al. (2006), baseando-se em comparações do comprimento total do lote haploide e das medidas do conteúdo de DNA (Gupta, 1976).

Resultados contraditórios com relação à simetria cariotípica de algumas espécies de *Crotalaria* podem ser encontrados segundo Mondin et al. (2007), devido, principalmente, ao tipo de pré-tratamento, ao modo de preparo da lâmina e ao tamanho reduzido dos cromossomos. Devido a este último fator, estes autores sugerem a análise de cromossomos na fase de paquíteno para tentar solucionar esta questão, a fim de se ter real noção de como é a morfologia dos cromossomos, principalmente nestas seções com alto grau de especialização floral.

Almada et al. (2006) analisaram o comportamento meiótico em oito espécies argentinas de *Crotalaria* e observaram bivalentes em anéis e algumas anormalidades, como cromossomos atrasados e ou com formação de pontes gerando fragmentos perdidos. Estes autores mostraram que os poliploides apresentaram meiose mais regular do que os diploides, refletindo na viabilidade do grão de pólen, sendo de 98% ou mais nos poliploides e 89% e 96% nos diploides. Os autores não obtiveram, ainda, uma explicação para estes resultados, mas sugerem que essas anormalidades sejam a causa da redução na viabilidade do grão de pólen.

Verma & Raina (1980) também estudaram a meiose de oito espécies de *Crotalaria*, descrevendo a formação de univalentes e multivalentes, bem como a formação de pontes com ou sem fragmentos.

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 haploides

encontrados foram $n=11$, 12, 13, 14 e 28. Nenhuma variabilidade intraespecífica foi detectada, com $n=14$ predominando. Somente o acesso de *S. rugosa* 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.

Biondo et al. (2005b) 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 $2n = 28$ cromossomos, 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 sobre este grupo tão importante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMADA, R.D.; DAVIÑA, J.R.; SEIJO, G. Karyotype analysis and chromosome evolution in southernmost South American species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.150, n.3, p.329-341, Mar. 2006.
- 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, v.27, n.5, p.715-721, set./out. 2003.
- ATCHINSON, E. Studies in Fabaceae. VI. Chromosome number among tropical woody species. **American Journal of Botany**, Columbus, v.38, p.538-547, 1951.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Fabaceae. **Caryologia**, v.27, n.1, p.17-32, 1974.
- 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, set. 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.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CASTRO, B. Cytogenetics and cytotaxonomy of brazilian species of *Senna* Mill. (Cassieae – Caesalpinioideae - Leguminosae). **Caryologia**, Tokyo, v.58, n.2, p.152-163, Apr./June 2005c
- BISBY, F.A. The evaluation and selection of characters in Angiosperm taxonomy: an example from *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.69, n.4, p.1149-1160, 1970.
- BISBY, F.A. The role of taxometrics in angiosperm taxonomy. I. Empirical comparisons of methods using *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.72, n.3, p.699-726, 1973.

BISBY, F.A.; POLHILL, R.M. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. II. Parallel taximetric and orthodox studies in *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.72, n.3, p.727-742, 1973.

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.

BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; POLHILL, R.M. Observations on the cytology and seed-proteins of various African species of *Crotalaria* L. (Leguminosae). **New Phytologist**, Cambridge, v.69, n.1, p.117-131, 1970.

BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLIGAARD, B.B.; LEWIS G.P. 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.

CAVALCANTI, M.L.F.; DANTAS, I.C.; MARTINS, P.L.; SILVA, G.M.C.; ALMEIDA, M.V.A.; LIRA, R.S. Identificação dos vegetais destinados a arborização de Campina Grande-PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v.3, n.1, 2003. Disponível em: <<http://ipe.rc.unesp.br/free/tecomaaarboreas.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

CHAPILL, J.A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. In: CRISP, M.D.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Phylogeny. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. Part 7, p.1-9.

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

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. Part 7, p.11-30.

DOYLE, J.J.; CHAPILL, J.A.; BAILEY, C.D.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, 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.
- FLORES, A.S. **Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) no Brasil**. 213p. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- FLORES, A.S.; CORRÊA, A.A.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; TOZZI, A. M.G.A. Chromosome numbers in brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.151, n.2, p.271-277, June 2006.
- 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, 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**, Tokyo, n.64, n.1, p.11-16, 1999.
- GUPTA, P.K. Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Crotalaria* (Angiospermae, Leguminosae). **Chromosoma**, New York, v.54, n.2, p.155-164, 1976.

IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. *Cassieae*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. Part 1, p.97-106.

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

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.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; BAILEY, C.D.; DOYLE, J.J. *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.

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.; SCHIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LYSÁK, M.A.; BERR, A.; PECINKA, A.; SCHMIDT, R.; MCBREEN, K.; SCHUBERT, I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n.3, p.5224-5229, Mar. 2006.

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

MANGOTRA, R.; KOUL, A. Base number in the genus *Crotalaria*: evidences from meiosis. **The Nucleus**, Oxford, v.34, p.158-161, 1991.

MEDINA, J.C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. São Paulo: Industria Gráfica Siqueira, 1959. 913p.

MONDIN, M. **Estudo da evolução cariotípica do ênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**. 2003. 115p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MORALES, A.G.; ANDRADE, L.M.; MENUZZO-MOLINA, S.C. Cytogenetic of *Crotalaria* genus (Leguminosae-Papilionoideae): classic to molecular. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE CITOGENÉTICA Y EVOLUCIÓN, 2., 2007, Palmira. **Anais...** Palmira: Universidad Nacional de Colômbia, 2007. p.189-195.

MORALES, A.G. **Evolução cromossômica de espécies de *Crotalaria* (L.) da seção Hedriocarpae, subseção Macrostachyae (Leguminosae-Papilionoideae)**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

OLIVEIRA, A.L.P.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Karyotype evolution in the genus *Crotalaria* L. **Cytologia**, Tokyo, v.64, n.1, 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, n.163, n.1/2, p.93-105, 1989.

PALOMINO, G.; VÁZQUEZ, R. Cytogenetic studies in mexican populations of species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, Tokyo, v.56, n.3, p.343-351, 1991.

POLHILL, R.M. Papilionoideae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Advance in legume systematics**. Part 1. Phylogeny. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.191-208

POLHILL, R.M. **Crotalaria in Africa and Madagascar**. Rotterdam: A.A. Balkeama, 1982. 389p.

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.

SHARMA, A.K. Polyploidy and chromosome size. **Chromosomes Today**, Moscow, v.3, p.248-252, 1970.

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.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnold, 1971. 216p.

TAPIA-PASTRANA, F; GALLEGOS-PACHECO, E; TEODORO-PARDO, C; MERCADO-RUARO, P. New cytogenetic information of two Mexican populations of *C. incana* L. (Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, Tokyo, v.70, n.3, p.207-212, 2005.

TONA, L.; CIMANGA, R.K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. *In vitro* antiparasitic 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.

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.

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

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.

VERMA, R.C.; RAINA, S.N. Cytogenetics of *Crotalaria*. II. Males meiosis in 8 species of *Crotalaria*. **Cytologia**, Tokyo, v.45, n.1/2, p.297-306, 1980.

WINDLER, D.R. Chromosome number for native North American unifoliate species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Brittonia**, New York, v.26, n.2, p.172-176, 1974.

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. Part 10, p.5-35.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M. SANDERSON, M. A phylogeny of legumes (leguminosae) based on analysis of the plastid *matk* gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, Columbus, v.9, n.11, p.1846-1862, Nov. 2004.

CAPÍTULO 2

Citologia da reprodução de espécies de *Senna* Mill. (Caesalpinioideae – Fabaceae) do sul de Minas Gerais

K. Ferreira¹, G.A. Torres¹, S.M. Sousa², I.V. Carvalho¹; L.C. Davide¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, CEP 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil

Correspondência com o autor: Tel: (35) 3829-1365; Fax: (35) 3829-1341.
E-mail: katia.lavras@ig.com.br (K. Ferreira).

RESUMO

O gênero *Senna* Mill. possui cerca de 260 espécies, com ampla distribuição geográfica. Por meio de estudos citogenéticos, vários autores têm determinado o número cromossômico, a cariomorfologia e o comportamento meiótico de algumas destas espécies. No entanto, não existem estudos comparativos envolvendo as diferentes espécies ou populações da mesma espécie, com relação a estas características. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar e comparar o número cromossômico, o comportamento meiótico e viabilidade do grão de pólen de onze espécies do gênero *Senna* Mill. incidentes no sul de Minas Gerais. Para isso, foram analisadas figuras meióticas obtidas por meio das técnicas de esmagamento e suspensão celular com secagem ao ar e obtido o índice meiótico. A viabilidade polínica dessas espécies foi determinada por testes de coloração e de germinação *in vitro*. As espécies apresentaram $n = 12, 13, 14,$ e 28 cromossomos, sendo o comportamento meiótico de *S. alata*, *S. siamea*, *S. silvestres bifaria* e *S. spectabilis* descrito pela primeira vez. Foram identificados acessos com $n=14$ e $n=28$ em *S. rugosa*. Os números cromossômicos relatados para algumas espécies coincidiram com os descritos para populações do sul do Brasil e do Pará. É apresentada uma discussão sobre o número básico do gênero, considerando a tendência de disploidia e ocorrência de dois ciclos de autopoliploidização no processo evolutivo de *Senna*. A maioria das espécies analisadas apresentou comportamento meiótico regular, alto índice meiótico e alta viabilidade do grão de pólen.

*Comitê Orientador: Dra. Giovana Augusta Torres – UFLA (Orientadora); Dra. Lisete Chamma Davide UFLA (Coorientadora)

ABSTRACT

The genus *Senna* Mill. comprises about 260 species with broad geographic distribution. Cytogenetic studies have described chromosome number, karyomorphology and meiotic behavior of some of these species. However, there is no comparative study of these species taking in account these characteristics. Thus, the present work aimed to describe and compare chromosome number, meiotic behavior and pollen grain viability of eleven species of *Senna* Mill. from South Minas Gerais. Meiotic figures were obtained by squashing or cell suspension and air drying techniques. Pollen viability was determined by staining tests germination *in vitro*. The species showed $n = 12$, 13, 14, and 28 chromosomes. For *S. alata*, *S. siamea*, *S. silvestres bifaria* and *S. spectabilis* this is the first description of meiotic behavior. Accessions with $n=14$ and $n=28$ were identified in *S. rugosa*. Chromosome numbers reported for some of the species matched with the ones described for populations from South Brazil and Pará State. We discuss the basic number of the genus, taken in account the tendency of dispoloidy and occurrence of two cycles of autopolyploidization along the evolution process of *Senna*. Most of the species showed regular meiotic behavior and high meiotic index and pollen grain viability.

* Guidance Committee: Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA (Major Professor);
Dra. Lisete Chamma Davide UFLA.

1 INTRODUÇÃO

A subfamília Caesalpinoideae (Fabaceae) tem posição basal nas análises filogenéticas e ampla diversidade na forma floral e ontogenia (Bruneau et al., 2001; Doyle, 1995; Doyle et al., 2000). É usualmente dividida em quatro ou cinco tribos: Cercideae, Caesalpineae, Cassieae e Detarieae, com Macrobieae (derivada de Detarieae), recentemente incluída (Tucker, 2003). Esta subfamília tem o número básico $x = 7$ e é considerada poliploide, com a prevalência de tetraplóides (Bandel, 1974; Goldblatt, 1981).

O grupo *Cassia sensu lato* (tribo Cassieae) inclui 650 espécies de árvores, arbustos e ervas com distribuição pantropical. Devido à sua complexidade, foi dividido, com base em caracteres florais, em três gêneros: *Cassia sensu stricto*, *Chamaecrista* Moench, e *Senna* Mill. (Boonkerd et al., 2005). Estudos taxonômicos desses três gêneros baseados em diferentes caracteres, como, por exemplo, proteínas de sementes (Guareeb et al., 1999), caracteres morfológicos, vegetativos e reprodutivos (Dulberger et al., 1994; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger; 1988; Irwin & Barneby, 1981; Irwin & Barneby, 1982; Owens & Lewis, 1989), características ontogenéticas (Tucker, 1996), sistemática molecular (Bruneau et al., 2001; Doyle et al., 2000) e citogenética (Biondo et al., 2005abc; Goldblatt, 1981), têm suportado essa separação.

O gênero *Senna* Mill., com aproximadamente 80% de suas 260 espécies em regiões neotropicais, é considerado parafilético e foi dividido em seis seções: *Psilorhegma*, *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiranisia*, *Paradyction* e *Astroites* (Irwin & Barneby, 1981; Irwin & Barneby, 1982). As espécies desse gênero têm grande potencial medicinal (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002; Evans et al., 2002; Lorenzi & Abreu, 2002; Samy & Ignacimutsu, 2001; Tona et al., 2004), ornamental

(Cavalcanti et al., 2003), para a produção de madeira e para a recuperação de áreas degradadas (Arato et al., 2003).

Os números cromossômicos em espécies de *Senna* são $2n = 22, 24, 26$ e 28 (Bandel 1974; Biondo et al., 2005abc; Coleman & Demenezes, 1980; Goldblatt, 1981; Irwin & Barneby, 1982; Irwin & Turner, 1960; Souza & Benko-Iseppon, 2004). O número básico para o gênero é aceito como $x = 14$, sendo este derivado de $x = 7$, que é o número básico do grupo *Cassia s.l.*, do qual *Senna* faz parte (Goldblatt, 1981; Irwin & Turner, 1960; Souza & Benko-Iseppon, 2004).

Estudos citogenéticos do gênero *Senna* determinaram o número cromossômico, a cariomorfologia e o comportamento meiótico de algumas espécies (Biondo et al., 2005abc; Souza & Benko-Iseppon, 2004;). No entanto, não existem estudos de comparação entre as diferentes espécies, com relação ao comportamento meiótico e tampouco entre espécies de diferentes regiões do país.

No presente trabalho, foram analisados o número cromossômico, o comportamento meiótico, o índice meiótico e a viabilidade do grão de pólen de onze espécies do gênero *Senna* Mill. incidentes no sul de Minas Gerais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Exsicatas do material botânico listado na Tabela 1 foram catalogadas no Herbário da Universidade Federal de Lavras (ESAL). Duplicatas deste material foram enviadas ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), onde

foram identificadas de acordo com o determinador Dr. Haroldo Cavalcante de Lima.

TABELA 1 Espécies do gênero *Senna* Mill. (Fabaceae-Caesalpinioideae) com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.

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

*21°03'45"S (Latitude) e 45°03'45"W (Longitude);

**21°08'08"S (Latitude) e 44°15'42"W (Longitude);

***21°14'43"S (Latitude) e 44°59'59"W (Longitude).

2.2 Análise meiótica

Os botões florais das espécies de *Senna* Mill. foram fixados em Carnoy (3 metanol:1 ácido acético), imediatamente após a coleta e armazenados a -20°C até o momento da utilização. Suspensões celulares foram feitas de botões com tamanhos previamente definidos pela técnica de esmagamento com o corante carmim acético a 1%. A suspensão celular foi preparada de acordo com Viccini et al. (2006), com algumas modificações. O material foi colocado em banho-maria com solução enzimática (Pectinex Ultra SP-L) a 34°C, por 4 a 6 horas. A suspensão final foi estocada a -20°C. As lâminas, secadas ao ar e coradas com solução Giemsa, foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmara (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

A meiose e o índice meiótico foram analisados em 5.000 meiócitos por espécie ($\% \text{ IM} = [\text{número de tétrades normais} / \text{total de meiócitos}] \times 100$) de acordo com Löve (1951).

2.3 Viabilidade do grão de pólen

Flores após a antese foram coletadas e as anteras fixadas em Carnoy (3 metanol:1 ácido acético), sendo armazenadas a -20°C até o momento da utilização. Material *in natura* (flores colhidas pela manhã, após a antese) foi utilizado nos testes com corantes e também nos testes de germinação *in vitro*.

2.3.1 Testes com corantes

A detecção da viabilidade do grão de pólen foi realizada por diferentes métodos (Tabela 2). A porcentagem de grãos de pólen viáveis foi estimada em 1.000 microsporócitos maduros fixados e ou *in natura* (Tabela 2) de cinco

lâminas por espécie, sendo cada lâmina preparada com anteras de flores diferentes e armazenadas em câmara úmida. Para os testes de coloração com a solução Alexander e com o 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), as lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens. Para o teste de coloração com a solução de diacetato de fluoresceína (FDA), as lâminas foram avaliadas em microscópio Olympus BX60 equipado com sistema de epifluorescência, tendo sido utilizado o filtro com comprimento de onda de excitação de 460-490 nm e de emissão de 515-550 nm. As imagens foram obtidas com câmera digital Canon PowerShot A620.

TABELA 2 Corantes e condições de diferentes testes de viabilidade de grão de pólen de espécies de *Senna* Mill.

Corantes	Tipo de material	Tempo e condições de armazenamento
Solução Alexander	fixado e <i>in natura</i>	24 horas, a 4°C
TTC 5% ¹	<i>in natura</i>	2 horas à temperatura ambiente, no escuro
TTC 50% ²	<i>in natura</i>	2 horas à temperatura ambiente, no escuro
FDA ³	<i>In natura</i>	30 minutos à temperatura ambiente, no escuro

¹ TTC – Trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) 5% em solução de sacarose a 5%;

² TTC – Trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) 5% em solução de sacarose a 50%;

³ FDA: diacetato de fluoresceína a 6,25 µg/mL em solução de sacarose a 25%.

2.3.2 Testes de germinação *in vitro*

Para a germinação dos grãos de pólen foi utilizado meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de solução de sacarose, variando de 5% a 60%. Doze lâminas, cada lâmina com anteras de flores diferentes e cada uma com uma solução de sacarose variando de 5% em 5%, foram montadas e armazenadas em câmara úmida, em estufa à temperatura de 28°C, por 24 horas. O meio de cultura que apresentou o maior número de grãos de pólen germinados (tubo polínico com tamanho igual ou superior ao do grão de pólen) foi selecionado e utilizado na próxima etapa. Para algumas espécies, foi necessário acrescentar ácido bórico (H_3BO_3) nas concentrações de 0,01% ou 0,03%. Cinco lâminas, cada lâmina com anteras de flores diferentes, foram montadas no meio de cultura selecionado na etapa anterior, armazenadas em câmara úmida, em estufa à temperatura de 28°C, por 24 horas, sendo estimada a porcentagem de germinação dos grãos de pólen. As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tamanho ideal de botões florais para análise meiótica em espécies do gênero *Senna* variou de 4 a 6,5 mm. Nas espécies estudadas, *S. alata* e *S. rugosa*, foi observado assincronismo entre tamanho do botão floral e fases meióticas esperadas.

As espécies do gênero *Senna* da série Baccilares (Seção Chamaefistula) apresentaram $n = 13$ cromossomos (Tabela 3), exceto a espécie *S. rugosa*, a qual apresentou $n = 14$ e 28 cromossomos. Essa variação intraespecífica em *S. rugosa* está relatada na literatura, uma vez que Coleman & Demenezes (1980) encontraram $n=14$ para acessos do estado de São Paulo, enquanto Biondo et al. (2005a) identificaram um acesso tetraploide ($n = 28$) no estado do Paraná. A identificação de acessos diploides e tetraploides em Minas Gerais reforça a existência de raças cromossômicas em *S. rugosa* e a importância da poliploidia no processo evolutivo desta espécie.

A única espécie estudada da série Interglandulosae (Seção Peiranisia), *S. multijuga*, apresentou $n = 12$ cromossomos. Todas as demais espécies apresentaram $n = 14$ cromossomos. O comportamento meiótico de *S. alata*, *S. siamea*, *S. silvestres bifaria* e *S. spectabilis* foi descrito pela primeira vez neste trabalho, assim como a determinação do número cromossômico de *S. spectabilis*.

As espécies *S. macranthera macranthera*, *S. splendida splendida*, *S. cernua*, *S. alata*, *S. siamea* e *S. silvestres bifaria* apresentaram pareamento normal de seus bivalentes na diacinese e segregação cromossômica regular nas anáfases I e II (Tabela 3 e Figura 1). Porém, das metáfases I analisadas de *S. cernua*, 25% mostraram cromossomos atrasados (Figura 1G), irregularidade não observada nessa espécie por Biondo et al. (2005c).

Na espécie *S. rugosa*, tanto nas células diploides quanto nas células tetraploides, foram observados univalentes e quadrivalentes em todas as diacineses analisadas (Tabela 3 e Figura 2). Esses resultados suportam a hipótese de autoploidia levantada por Biondo et al. (2005c) em função da observação de quadrivalentes e multivalentes em cerca de 50% das células observadas.

TABELA 3 Número haploide de cromossomos (n); comportamento meiótico e índice meiótico (IM) de espécies do gênero *Senna* Mill.

Espécies	n	Meiose I		Meiose II		IM %
		Diacinese ⁹	Metáfase I	Anáfase I	Anáfase II	
<i>Senna macranthera macranthera</i> ¹	13	13II	Regular	Regular	Regular	99,07
<i>Senna rugosa</i> ¹	14; 28	I; II; IV	-	Irregular	-	-
<i>Senna splendida splendida</i> ¹	13	13II	Regular	Regular	Regular	99,80
<i>Senna cernua</i> ²	14	14II	Regular	Regular	Regular	99,84
<i>Senna corymbosa</i> ³	14	I; II; IV	Regular	Regular	Regular	99,90
<i>Senna pendula</i> ³	14	II; I; IV	Regular	Regular	Regular	100,00
<i>Senna siamea</i> ⁴	14	14II	Regular	Regular	-	99,50
<i>Senna silvestris bifaria</i> ⁵	14	14II	Regular	Regular	Regular	99,03
<i>Senna spectabilis</i> ⁶	14	II; IV	Regular	Regular	Regular	99,66
<i>Senna multijuga</i> ⁷	12	I; II; IV; A	Irregular	Regular	Regular	94,08
<i>Senna alata</i> ⁸	14	14II	Regular	Regular	Regular	99,88

Seção *Chamaefistula*: ¹Série Baccilares; ² Série Basiglandulosae; ³ Série Basiglandulosae; ⁴ Série Floridae; ⁵ Série Sapindifoliae;

Seção *Peirania*: ⁶ Série Excelsae; ⁷ Série Interglandulosae;

Seção *Senna*: ⁸ Série Pictae;

⁹ I – univalentes; II – bivalentes; IV – quadrivalentes; A – aderência.

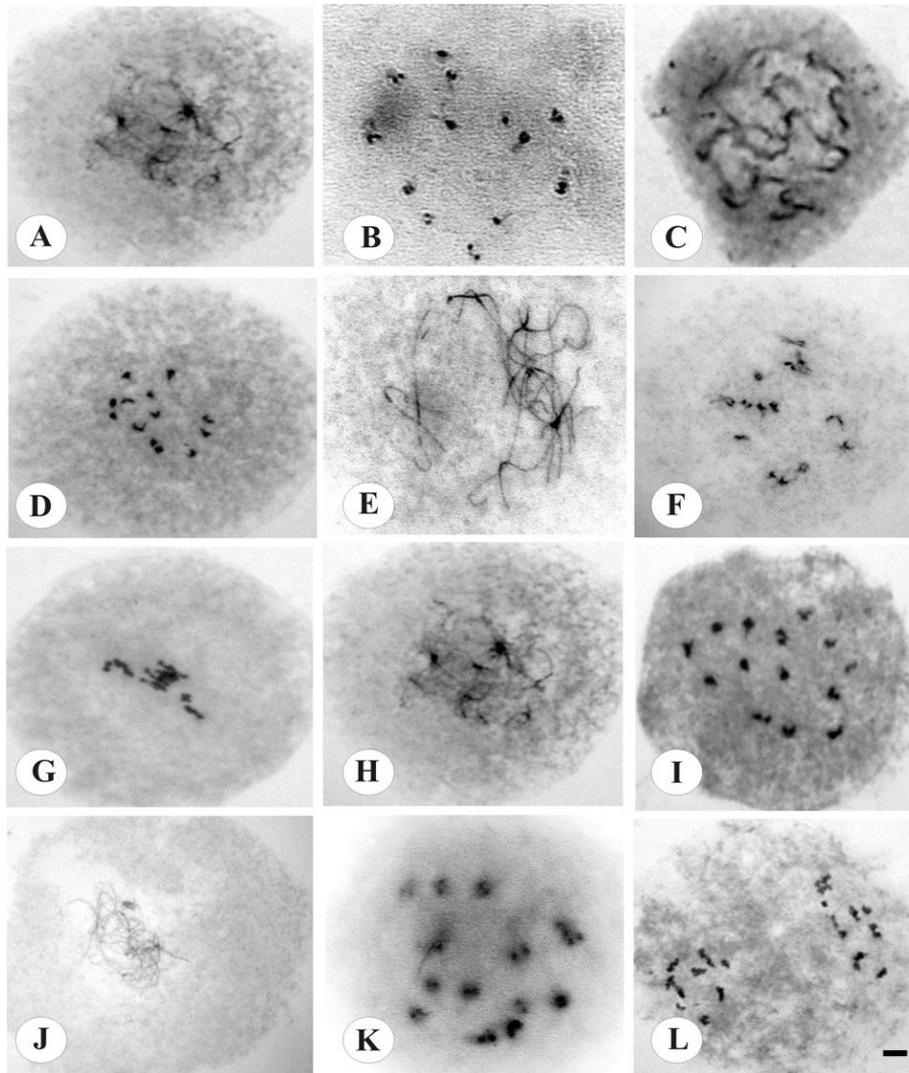


FIGURA 1 Meiose em espécies de *Senna* Mill. *Senna macranthera macranthera*: (A) zigóteno, (B) diacinese (n = 13); *Senna splendida splendida*: (C) paquíteno, (D) diacinese (n = 13); *Senna cernua*: (E) paquíteno, (F) diplóteno com quiasmas (n = 14), (G) metáfase I com segregação precoce de cromossomos; *Senna alata*: (H) paquíteno, (I) diacinese (n = 14); *Senna siamea*: (J) paquíteno, (K) diacinese (n = 14); *Senna silvestris bifaria*: (L) anáfase II inicial (n = 14). Barra: 10 µm.

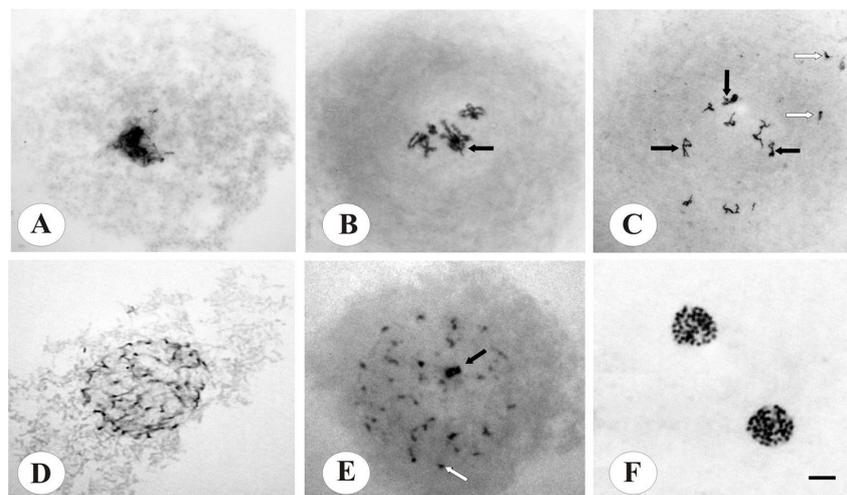


FIGURA 2 Comportamento meiótico de *Senna rugosa*. Acesso diploide ($n = 14$): (A) zigóteno; (B) diplóteno com multivalentes (seta); (C) diacinese com univalentes (seta branca) e quadrivalentes (seta preta); acesso tetraploide ($n = 28$): (D) diplóteno; (E) diacinese com univalentes (seta branca) e tetravalentes (seta preta); (F) telófase I ($n = 28$). Barra: 10 μm .

Em 50% das diacineses e metáfases I analisadas da espécie *S. corymbosa*, foram observados univalentes e quadrivalentes (Figuras 3A-C). Essas irregularidades também foram constatadas por Biondo et al. (2005a) em populações desta espécie do sul do Brasil, juntamente com a observação de trivalentes e multivalentes, não observados no presente trabalho.

A outra espécie da série Coluteoideae, *S. pendula*, também apresentou univalentes em todas as diacineses e tetravalentes em 57,14% de suas células em diacinese (Figuras 3D-F). Biondo et al. (2005c) observaram apenas bivalentes.

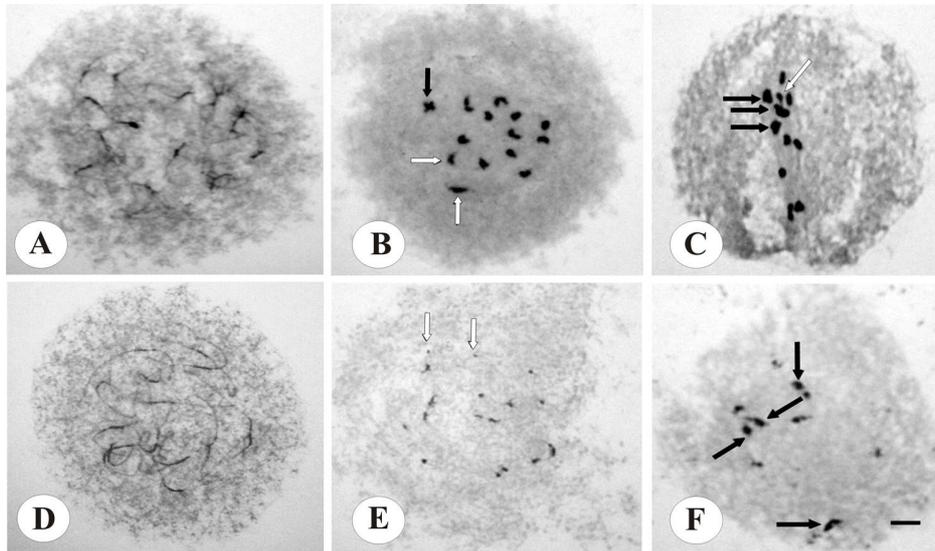


FIGURA 3 Meiose em espécies de *Senna* Mill. *Senna corymbosa* (n = 14): paquíteno (A), univalentes (seta branca) e quadrivalentes (seta preta) na diacinese (B) e metáfase I (C) (n = 14); *Senna pendula* (n = 14): paquíteno (D), diacinese com univalentes (seta branca) (E) e quadrivalentes (seta preta) (F). Barra: 10 μ m.

A espécie *S. multijuga* apresentou 2,27% de suas células em diacinese contendo aderência; 84,09% de diacineses com univalentes e quadrivalentes; 55,56% de metáfases I com cromossomos atrasados e 25% de anáfases com cromossomos atrasados e/ou ponte (Figuras 4A-E). Esses dados corroboram os obtidos por Biondo et al. (2005c), exceto pelo fato de terem observado univalentes e cromossomos atrasados nas anáfases.

Em todas as diacineses de *S. spectabilis* foram observados tetravalentes (Figura 4G) e em 25% das metáfases I existiam cromossomos atrasados (Figura 4H). Apesar da alta porcentagem desses quadrivalentes, a espécie teve uma segregação cromossômica regular nas anáfases.

Com relação aos índices meióticos e aos testes de viabilidade polínica, *S. macranthera macranthera*, *S. splendida splendida*, *S. alata*, *S. siamea*, *S. cernua*, *S. silvestres bifaria* e *S. corymbosa* apresentaram índices meióticos e viabilidade polínica com a solução Alexander superiores a 99%. Para as outras espécies analisadas, além do teste de viabilidade polínica com a solução Alexander, foram realizados outros testes (Tabela 4), devido ao fato de estas apresentarem algum tipo de irregularidade meiótica. A espécie *S. pendula* foi utilizada como testemunha, já que não apresentou nenhum tipo de anormalidade.

O fato de a espécie *S. rugosa* possuir irregularidades no pareamento de seus cromossomos poderia explicar a baixa porcentagem de grãos de pólen viáveis e germinados (Tabela 4 e Figura 5 A-B). Esses dados diferiram da alta porcentagem de grãos de pólen viáveis (98,23%) obtidos por Biondo et al. (2005c) com o teste de coloração utilizando carmin propiônico a 2%.

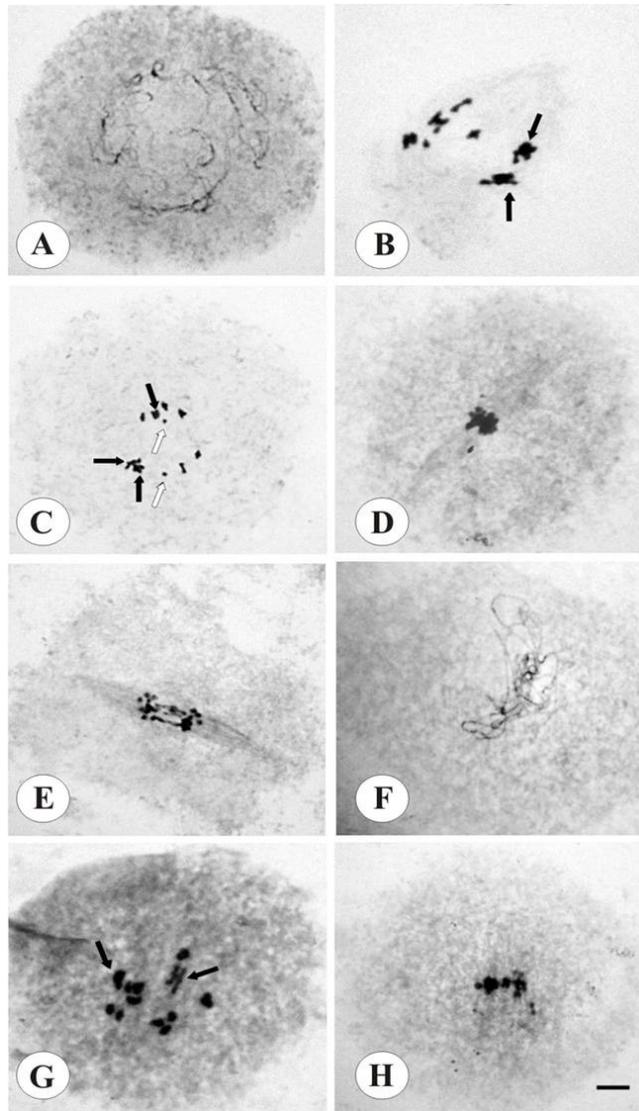


FIGURA 4 Meiose em espécies de *Senna* Mill. *Senna multijuga* (n = 12): (A) paquíteno; (B) diacinese com aderência (seta) e (C) univalentes (seta branca) e quadrivalentes (seta preta); (D) metáfase I com cromossomos atrasados; (E) anáfase com cromossomos atrasados e ponte. *Senna spectabilis* (n = 14): (F) paquíteno; (G) diacinese com quadrivalentes (seta); (H) metáfase I com cromossomo atrasado. Barra: 10 μ m.

TABELA 4 Porcentagem de viabilidade polínica determinada por testes de coloração (VP %) e de germinação *in vitro* (G %) de espécies do gênero *Senna* Mill.

Espécies	VP% - Coloração				G%	
	AF ¹	AI ²	TTC 5%	TTC 50%		FDA
<i>Senna rugosa</i>	2,84	55	2,46	11	20,1	3*
<i>Senna multijuga</i>	57,3	44,2	56,12	81,1	84,7	2,5**
<i>Senna pendula</i>	98,6	96	53	56,14	90,12	37,4*
<i>Senna spectabilis</i>	85	72	37	70,32	94,66	-

¹ - solução de Alexander com grãos de pólen fixados;

² - solução de Alexander com grãos de pólen *in natura*;

* - meio líquido: solução de sacarose a 15% com 0,01% de ácido bórico;

** - meio líquido: solução de sacarose a 55% com 0,03% de ácido bórico.

A espécie *S. multijuga* apresentou várias irregularidades meióticas como discutido anteriormente, porém, foram observados alto índice meiótico (94,08%) e altas porcentagens de viabilidade polínica com os testes de coloração FDA e TTC-50% (Tabela 4). Com os testes com TTC-5% e com a solução Alexander com grãos de pólen fixados e *in natura* estes valores foram menores (Tabela 4) (Figuras 5C-D). Biondo et al. (2005c) encontraram 94,79% de grãos de pólen viáveis com o Carmim Propiônico 2%. Com relação ao teste de germinação, pode-se constatar uma baixa porcentagem (2,5%). Isso pode ser justificado pela ocorrência de alterações pós-meioticas, não avaliadas no presente trabalho, ou pela composição inadequada do meio de cultura, sendo necessários mais experimentos para adequá-lo a essa espécie.

Da mesma maneira, *S. pendula* apresentou alto índice meiótico (100%) e altas porcentagens de viabilidade polínica com os testes de coloração, tendo uma maior porcentagem de grãos de pólen viáveis determinada pela solução de Alexander, tanto com material fixado quanto *in natura* e pelo FDA (Tabela 4). Esta foi a espécie com a maior porcentagem de grãos de pólen germinados (Tabela 4) (Figuras 5E-F).

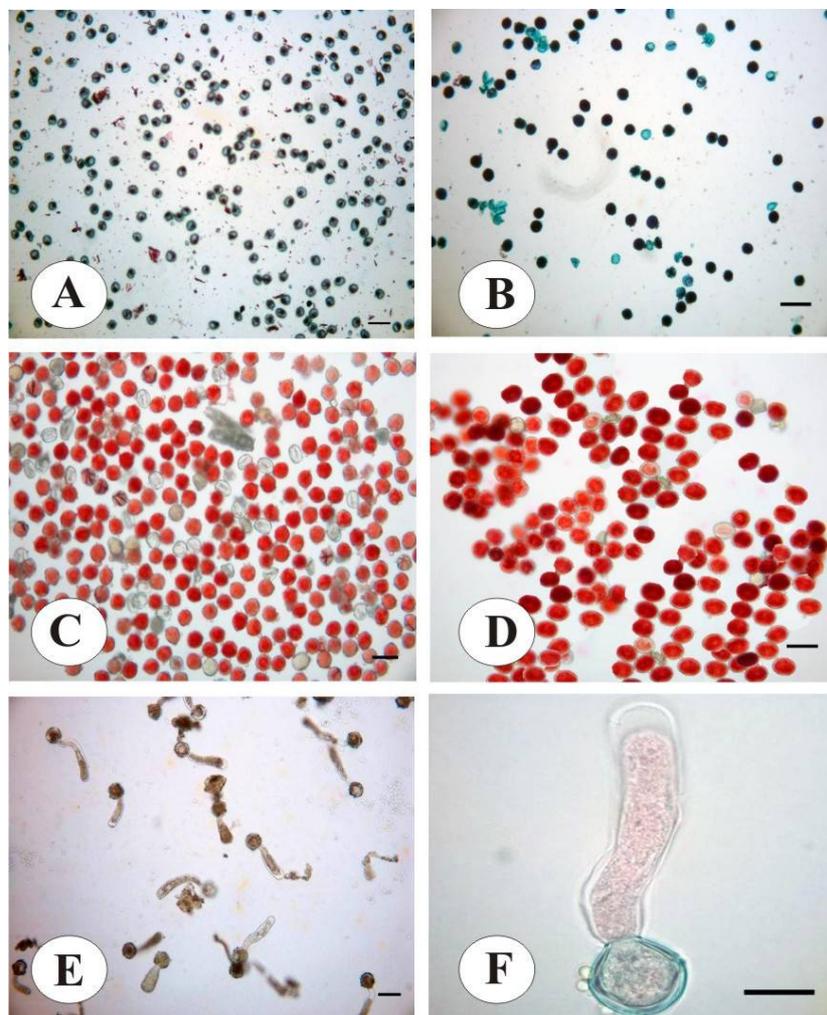


FIGURA 5 Viabilidade polínica em espécies de *Senna* Mill. *Senna rugosa*: (A) grãos de pólen corados com a solução Alexander fixados e (B) *in natura*, microsporócitos com citoplasma corado (roxo) e inteiro são viáveis; já aqueles com citoplasma pouco corado (verde) e não-inteiro são inviáveis; *Senna multijuga*: (C) grãos de pólen *in natura* corados com tetrazólio a 5% e (D) a 50%, microsporócitos com coloração vermelha carmim são viáveis e aqueles incolores, inviáveis; *Senna pendula*: (E) grãos de pólen germinados em solução de sacarose, destacando-se (F) o tubo polínico (barra: 20 μ m). Barra: 50 μ m.

Como *S. spectabilis* teve uma segregação regular nas anáfases, apesar de relatada irregularidade no pareamento dos bivalentes, esta espécie apresentou alto índice meiótico (99,66%). O teste com o corante FDA para a viabilidade do grão de pólen foi o que obteve resultado mais próximo do índice meiótico (94,66%), seguido pela solução de Alexander com grãos de pólen fixados e *in natura* e TTC-50%. O teste com menor porcentagem de viabilidade polínica foi o TTC-5% (Tabela 4).

Nas espécies *S. corymbosa*, *S. pendula*, *S. multijuga*, *S. spectabilis* e *S. rugosa* (acessos com n=14 e com n=28) foi demonstrada a existência de quadrivalentes. A ocorrência desse tipo de pareamento evidencia a homeologia entre os cromossomos desse complemento, sugerindo que essas espécies passaram por ciclos anteriores de poliploidização. Desta maneira elas seriam paleopoliploides (Leitch & Bennet, 1997; Murray, 2002;) que se comportam como diploides pelo tipo de herança de seus genes e arranjo cromossômico (Schifino-Wittmann et al., 2004).

A observação de multivalentes em espécies de *Leucaena* já foi usada como evidência citológica de ocorrência de poliploidia antiga nesse gênero, levando à hipótese de que espécies consideradas diploides seriam, na realidade, paleopoliploides (Boff & Schifino-Wittmann, 2003). A ocorrência de paleopoliploidia tem sido demonstrada em vários grupos por meio de diferentes técnicas moleculares, tais como hibridização genômica *in situ* (GISH) no gênero *Dahlia* (Gatt et al., 1999); integração de mapas físicos e genéticos em soja (Walling et al., 2006) e análise de ESTs em espécies de Compositae (Barker et al., 2008).

A hipótese de existência de espécies paleopoliploides em *Senna* é também subsidiada pelo fato de a subfamília Caesalpinioideae ter sido umas das primeiras a divergir dentro de Fabaceae, considerando o aparecimento das leguminosas no Eoceno, a mais de 50 milhões de anos atrás (Doyle & Luckow,

2003, Wojciechowski, 2003). Outra questão seria que a maioria das espécies do gênero *Senna* apresenta número básico maior de cromossomos ($x = 14$), quando comparado com o número básico do grupo *Cassia* s.l. ($x = 7$), ao qual esse gênero pertence.

Portanto o número cromossômico básico para o gênero *Senna* deve ser $x = 7$. Nesse caso, as espécies com $n=14$ seriam tetraploides. Em *S. rugosa*, o acesso com $n=28$ seria octoploide.

Assim, é importante estender as investigações citogenéticas a um número maior de espécies do gênero e incorporar técnicas moleculares, especialmente mapas físicos e genéticos, para verificar a hipótese de paleopoliploidia.

4 CONCLUSÃO

A autopoliploidização é um fenômeno importante na evolução do gênero *Senna*, sendo provavelmente um evento antigo que gerou paleopoliploides.

O número básico sugerido para o gênero *Senna* é $x=7$

Senna rugosa apresenta variação de ploidia entre populações.

Para as demais espécies analisadas do gênero *Senna* de Lavras e região, sul de Minas Gerais, não existe variação de número cromossômico quando comparadas às respectivas espécies do estado do Pará e do sul do Brasil.

A maioria das espécies analisadas apresenta comportamento meiótico regular e altas porcentagens de índice meiótico e viabilidade do grão de pólen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, v.27, n.5, p.715-721, set./out. 2003.

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

BARKER, M.S.; KANE, N.C.; MATVIENKO, M.; KOZIK, A.; MICHELMORE, R.W.; KNAPP, S.J.; RIESEBERG, L. Multiple Paleopolyploidizations during the evolution of the compositae reveal parallel patterns of duplicate gene retention after millions of years. **Molecular Biology and Evolution**, v.25, n.11, p.2445–2455, ago. 2008.

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, set. 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.

BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CASTRO, B. Cytogenetics and cytotaxonomy of brazilian species of *Senna* Mill. (Cassieae – Caesalpinioideae - Leguminosae). **Caryologia**, Tokyo, v.58, n.2, p.152-163, Apr./June 2005c.

BOFF, T.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Segmental allopolyploidy and aleopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. **Hereditas**, Lund, v. 138, p. 27-35, 2003.

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.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLIGAARD, B.B.; LEWIS G.P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**, New York, v.23, n.3, p.487-514, July/Sept. 2001.

CAVALCANTI, M.L.F.; DANTAS, I.C.; MARTINS, P.de L.; SILVA, G.M.da C.; ALMEIDA, M.V.A. de; LIRA, R.S. Identificação dos vegetais destinados a arborização de Campina Grande-PB. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v.3, n.1, 2003. Disponível em:< <http://ipe.rc.unesp.br/free/tecomarboreas.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

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.

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

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. Part 7, p.11-30.

DOYLE, J.J.; CHAPILL, J.A.; BAILEY, C.D.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, 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.

- GATT, M.; HAMMETT, K.; MURRAY, B.G. Confirmation of ancient polyploidy in *Dahlia* (Asteraceae) species using genomic *in situ* hybridization. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 39-48, 1999.
- 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. Part 2, 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.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. *Cassieae*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. Part 1, p.97-106.
- IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. The 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.
- 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
- LEITCH, I.J.; BENNET, M.D. Polyploidy in angiosperms. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.2, n.12, p.470-476, Dec.1997.
- LORENZI, H.; ABREU, F.J.M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Intituto Plantarum, 2002. 512p.
- LÖVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behaviour of brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Madison, v.43, n.1, p.72-76, Jan. 1951.
- MURRAY, B.G. Trees, maps and FISH: the application of genome based technologies to the analysis of chromosome evolution. **Current Genomics**, v.3, n.6, p.539-550, Dec. 2002.

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, n1/2, p.93-105, 1989.

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

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.10, n.2, p.151-157, abr./jun. 2004.

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

TONA, L.; CIMANGA, R.K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T., APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fraction from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.93, n.1, p.27-32, July 2004.

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.

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

VICINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M M.; COSTA, D.C.S.; ROMANEL, E.C.; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae), **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v.256, n.1/4, p.1-178, Nov. 2006.

WALLING, J.G.; SHOEMAKER, R.; YOUNG, N., MUDGE, J.; JACKSON, S. Chromosome-level homeology in paleopolyploid soybean (*Glycine max*) revealed through integration of genetic and chromosome maps. **Genetics**, Austin, v.172, n.3, p.1893-1900, Mar. 2006.

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. Part 10, p.5-35.

CAPÍTULO 3

Comportamento meiótico anormal em espécies de *Crotalaria* L. (Faboideae-Fabaceae)

K. Ferreira¹, G.A. Torres¹, I.V. Carvalho¹; L.C. Davide¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

Correspondência com o autor: Tel: (35) 3829-1365; Fax: (35) 3829-1341.
E-mail: katia.lavras@ig.com.br (K. Ferreira).

RESUMO

O gênero *Crotalaria* L. é o terceiro maior gênero da subfamília Faboideae (Fabaceae) e compreende aproximadamente 600 espécies herbáceas e arbustivas, distribuídas nos trópicos e sub-trópicos. No Brasil há 31 espécies nativas de *Crotalaria* e 11 introduzidas, as quais podem ser úteis na indústria (papel e fibra), na agricultura (fixação de nitrogênio e controle biológico de nematóides) e no paisagismo. O número cromossômico da maioria das espécies é $2n = 16$, sendo propostos dois números básicos $x = 7$ e $x = 8$ para o gênero. Neste trabalho, três espécies de *Crotalaria* foram comparadas com relação ao comportamento meiótico e à viabilidade dos grãos de pólen. A análise meiótica foi realizada através da técnica de secagem ao ar, sendo a viabilidade dos grãos de pólen avaliada por testes de coloração (Corante de Alexander, Cloreto de Tetrazólio e Diacetato de Fluoresceína) e por teste de germinação em solução de sacarose. Em *C. zanzibarica*, *C. micans* e *C. spectabilis* foram observados oito bivalentes, confirmando relatos prévios em populações de outras regiões do país e fora do país. As três espécies tiveram comportamento meiótico irregular com anormalidades típicas em cada uma delas. As principais anormalidades observadas foram: em *C. micans*, citomixia e irregularidade de pareamento dos bivalentes na diacinese; em *C. spectabilis*, irregularidade de pareamento dos bivalentes no diplóteno; e em *C. zanzibarica*, núcleo fortemente condensado nas fases de leptóteno e zigóteno. Essas espécies apresentaram, respectivamente, 15%, 17% e 7% de seus grãos de pólen viáveis. A baixa viabilidade dos grãos de pólen detectada nas três espécies pode estar associada às anormalidades observadas na meiose.

*Comitê Orientador: Dra. Giovana Augusta Torres – UFLA (Orientadora); Dra. Lisete Chamma Davide UFLA (Coorientadora)

ABSTRACT

The genus *Crotalaria* L. is the third largest genus of the subfamily Faboideae (Fabaceae) and comprises about 600 herbaceous and shrub species distributed in the tropics and sub-tropics. In Brazil there are 31 native and 11 introduced species of *Crotalaria*. These species can be useful in industry (paper, fiber), in agriculture (nitrogen fixation, biological control of nematods) and in landscaping. Chromosome number in most species is $2n = 16$ and two different basic number, $x=8$ and $x=7$, are considered. In this work three species of *Crotalaria* have been compared with regard to meiotic behavior and pollen grain viability. Slides for meiotic analysis were made by air drying technique. Pollen grain viability was measured by staining procedures (Alexander staining, Tetrazolium Chloride and Fluorescein Diacetate) and by *in vitro* germination in sucrose solution. Eight bivalents were observed in *C. zanzibarica*, *C. micans* and *C. spectabilis*, confirming previous reports for populations from another Brazilian regions as well as from other countries. All species showed abnormal meiotic behavior, with typical irregularity in each one of them. The main observed abnormalities were: in *C. micans*, cytomixis and abnormal chromosome pairing in diakinesis; in *C. spectabilis*, abnormal chromosome pairing in diplotene; in *C. zanzibarica*, shrunken nuclei in leptotene and zygotene. Pollen grain viability values were, respectively, 15%, 17% and 7%. This low pollen grain viability can be associated to the irregularities observed in meiosis.

* Guidance Committee: Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA (Major Professor);
Dra. Lisete Chamma Davide UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Crotalaria L., pertencente à tribo Crotalarieae, é o terceiro maior gênero da subfamília Faboideae, possuindo cerca de 600 espécies herbáceas e arbustivas distribuídas nos trópicos e nos subtropicais (Polhill, 1982). No Brasil, há 31 espécies nativas de *Crotalaria* e 11 introduzidas (Flores, 2004), algumas com importância econômica, devido ao uso na indústria de papel e fibra, na agricultura em sistemas de rotação de culturas como fixadores de nitrogênio, no controle biológico de nematóides, na alimentação animal, na remoção de metais tóxicos e na ornamentação, entre outros (Polhill, 1982; Medina, 1959).

Para o gênero *Crotalaria*, os números cromossômicos de $n = 8$, 16 , 7 e 21 têm sido relatados, dos quais $n = 8$ e 7 são os mais frequentemente encontrados (Palomino & Vázquez, 1991). A hipótese mais aceita é de que o gênero seja dibásico com $x = 7$ e $x = 8$ (Polhill, 1982) e que $x = 7$ teria derivado de $x = 8$ em decorrência de aneuploidia ou de rearranjos estruturais envolvendo a perda de um centrômero (Lysak et al., 2006; Stebbins, 1971). Dentro da tribo Crotalarieae, o gênero se distingue, uma vez que $x = 9$ é o número básico que tem sido proposto para essa tribo (Goldblatt, 1981).

Considerando estes números básicos, o gênero compreende uma maioria de espécies diploides (Mangotra & Koul, 1991; Oliveira & Aguiar-Perecin, 1999; Palomino & Vázquez, 1991). O número cromossômico da maioria das espécies de *Crotalaria* investigadas é $2n = 16$, com exceção de algumas que apresentam $2n = 14$, e outras que são poliploides ($2n = 32$) (Boulter et al., 1970; Oliveira & Aguiar-Perecin, 1999; Verma et al., 1984; Windler, 1974).

Com relação ao comportamento meiótico, Almada et al. (2006) analisaram oito espécies argentinas de *Crotalaria* e observaram bivalentes em anel e algumas anormalidades, como cromossomos atrasados e ou com formação

de pontes gerando fragmentos perdidos. Verma & Raina (1980) também estudaram a meiose de oito espécies de *Crotalaria*, descrevendo a formação de univalentes e multivalentes, bem como a formação de pontes com ou sem fragmentos.

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o comportamento meiótico, bem como o índice meiótico e a viabilidade do grão de pólen de três espécies do gênero *Crotalaria* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Exsicatas do material botânico listado na Tabela 1 foram catalogadas no Herbário da Universidade Federal de Lavras (ESAL). Duplicatas deste material foram enviadas ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), onde foram identificadas de acordo com o determinador Dr. Haroldo Cavalcante de Lima.

TABELA 1 Espécies do gênero *Crotalaria* L. (Fabaceae-Faboideae) com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.

ESPÉCIE	ORIGEM	NA	ESAL
<i>Crotalaria spectabilis</i> Roth	Ijaci*	5	22.066
<i>Crotalaria zanzibarica</i> Benth	Ijaci	10	22.067
<i>Crotalaria micans</i> Link	Lavras**	10	22.070

*21°11'15"S (Latitude) e 44°56'15"W (Longitude);

**21°14'43"S (Latitude) e 44°59'59"W (Longitude).

2.2 Análise meiótica

Os botões florais das espécies de *Crotalaria* L. foram fixados em Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) imediatamente após a coleta e armazenados a -20°C. Suspensões celulares foram feitas de botões com tamanhos previamente definidos pela técnica de esmagamento com o corante carmim acético a 1%. A suspensão celular foi preparada de acordo com Viccini et al. (2006), com algumas modificações. O material foi colocado em solução enzimática (Pectinex Ultra SP-L) a 34°C, em banho-maria, por 4 a 6 horas. A suspensão final foi estocada a -20°C. As lâminas, secas ao ar e coradas com solução Giemsa, foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens.

As fases meióticas e o índice meiótico foram analisados de 5.000 meiócitos por espécie ($\% \text{ IM} = [\text{número de tétrades normais} / \text{total de meiócitos}] \times 100$), de acordo com Löve (1951).

2.3 Viabilidade do grão de pólen

Flores após a antese foram coletadas e as anteras fixadas em Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) e armazenadas a -20°C. Material *in natura* (flores colhidas pela manhã após a antese) foi utilizado nos testes com corantes e também nos testes de germinação *in vitro*.

2.3.1 Testes com corantes

A detecção da viabilidade do grão de pólen foi realizada por diferentes métodos (Tabela 2). A porcentagem de grãos de pólen viáveis foi estimada em 1.000 microsporócitos maduros fixados e ou *in natura* (Tabela 2) de cinco lâminas por espécie, sendo cada lâmina preparada com anteras de flores diferentes e armazenadas em câmara úmida. Para os testes de coloração com a solução Alexander e com o 2,3,5 – trifenil cloreto de tetrazólio (TTC), as

lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS), equipado com microcâmera (Nikon Digital Sight DS-Fi1) para digitalização das imagens. Para o teste de coloração com o diacetato de fluoresceína (FDA), as lâminas foram avaliadas em microscópio Olympus BX60 equipado com sistema de epifluorescência, tendo sido utilizado o filtro com comprimento de onda de excitação de 460-490 nm e de emissão de 515-550 nm. As imagens foram obtidas com câmera digital Canon PowerShot A620.

TABELA 2 Corantes e condições de diferentes testes de viabilidade de grão de pólen de espécies de *Crotalaria* L.

Corantes	Tipo de material	Tempo e condições de armazenamento
Solução Alexander	fixado e <i>in natura</i>	24 horas, a 4°C
TTC 5%¹	<i>in natura</i>	2 horas à temperatura ambiente, no escuro
TTC 50%²	<i>in natura</i>	2 horas à temperatura ambiente, no escuro
FDA³	<i>In natura</i>	30 minutos à temperatura ambiente, no escuro

¹ TTC – Trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) 5% em solução de sacarose a 5%;

² TTC – Trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) 5% em solução de sacarose a 50%;

³ FDA: diacetato de fluoresceína a 6,25 µg/mL em solução de sacarose a 25%.

2.3.2 Testes de germinação *in vitro*

Para a germinação dos grãos de pólen foi utilizado meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações de solução de sacarose, variando de 5% a 60%. Doze lâminas, cada lâmina com anteras de flores diferentes e cada

uma com uma solução de sacarose variando de 5% em 5%, foram montadas e armazenadas em câmara úmida, em estufa, à temperatura de 28°C, por 24 horas. O meio de cultura que apresentou o maior número de grãos de pólen germinados (tubo polínico com tamanho igual ou superior ao do grão de pólen) foi selecionado e utilizado na próxima etapa. Cinco lâminas, cada lâmina com anteras de flores diferentes, foram montadas no meio de cultura selecionado na etapa anterior, armazenadas por 24 horas em câmara úmida, em estufa, à temperatura de 28°C. Após esse período, as lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Leica DMLS) para a determinação da porcentagem de germinação dos grãos de pólen. As imagens foram digitalizadas com microcâmara (Nikon Digital Sight DS-Fi1) acoplada ao microscópio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *C. zanzibarica* tem $2n = 16$ cromossomos, confirmando relatos de Atchinson (1950) e Yeh et al., (1986) (Figura 1). Em *C. micans* e *C. spectabilis* também foram observados oito bivalentes, confirmando relato para populações argentinas (Almada et al., 2006) e brasileiras, nas quais os números cromossômicos foram descritos em metáfases mitóticas (Flores et al., 2006; Mondin, 2003) (Figura 1). Estes dados corroboram os relatos descritos na literatura de que $n = 8$ seja um dos números cromossômicos básicos para o gênero *Crotalaria*.

Todas as três espécies analisadas apresentaram sincronia com relação ao tamanho do botão floral utilizado e suas respectivas fases meióticas. O tamanho ideal de botões florais foi: *C. zanzibarica* – 6,5-7 mm; *C. micans* – 4,5-5 mm e *C. spectabilis* – 5,5-6 mm.

Bivalentes em anel e bastão foram observados em 0,33% das diacineses de *C. zanzibarica* (Figura 2A) e em 0,73% das diacineses de *C. spectabilis* (Figura 2C), sendo que nessa última o pareamento em anel foi mais freqüente. Almada et al. (2006) também observaram essa predominância de bivalentes em anel em *C. spectabilis*. Em *C. micans* foram observados bivalentes com um quiasma (Figura 2B), não sendo encontradas as conformações em anel e bastão, as quais foram relatadas na mesma espécie por Almada et al. (2006).

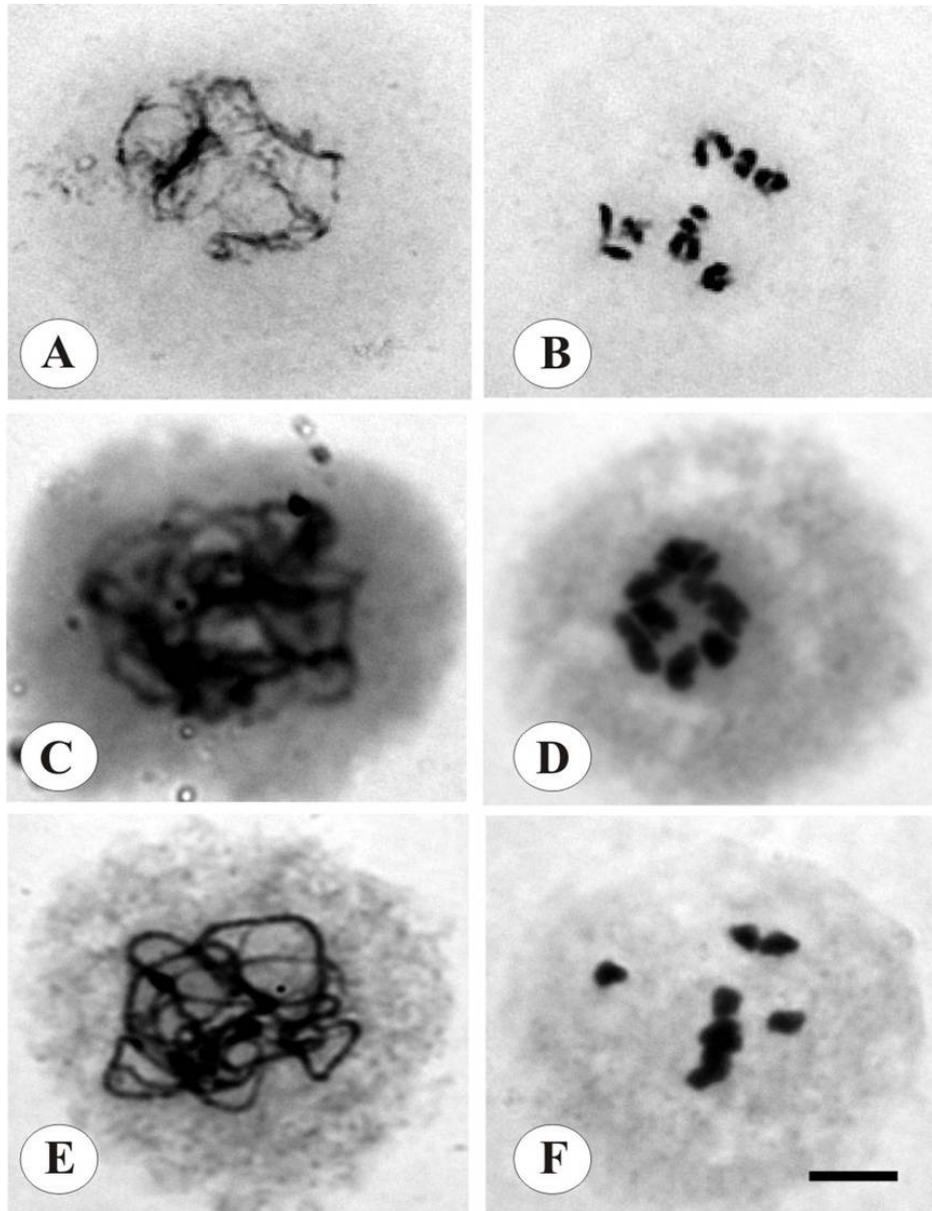


FIGURA 1 *Crotalaria zanzibarica*: (A) zigóteno e (B) diacinese (n = 8); *Crotalaria micans*: (C) paquíteno e (D) metáfase I (n = 8); *Crotalaria spectabilis*: (E) paquíteno e (F) metáfase I (n = 8). Barra: 5 μ m.

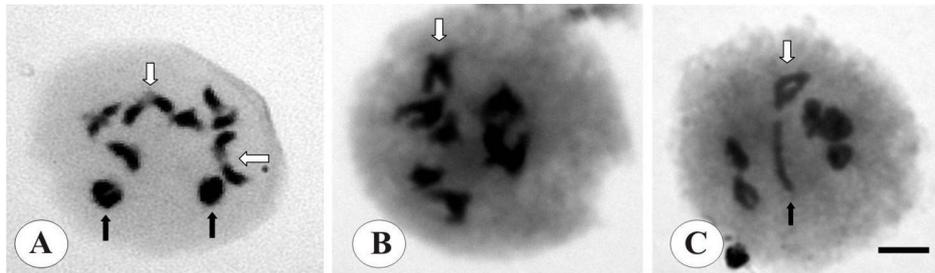


FIGURA 2 Diacineses das espécies de *Crotalaria* (n = 8). *C. zanzibarica*: (A) bivalentes em bastão (seta branca) e anel (seta preta); *C. micans*: (B) bivalentes com um quiasma (seta); *C. spectabilis*: (C) bivalentes em bastão (seta preta) e anel (seta branca). Barra: 5 μ m.

As três espécies tiveram comportamento meiótico irregular com várias anormalidades nas fases meióticas. Em *C. zanzibarica*, aproximadamente 14% dos meiócitos mostraram irregularidades. Destes, 89,19% se encontravam nas fases iniciais da meiose, com núcleo fortemente condensado, diferindo do padrão normal de leptóteno e zigóteno para essa espécie (Tabela 3 e Figura 3A). Foram observados cromossomos pegajosos (Figura 3B); cromossomos atrasados e ou perdidos na metáfase I e prófase II (Figuras 3C-D); irregularidade do fuso meiótico (Figura 3E) e tríades com micronúcleos (Figura 3F).

TABELA 3 Distribuição da porcentagem de irregularidades por fases meióticas de três espécies do gênero *Crotalaria* L.

FASE	MEIÓCITOS IRREGULARES (%)		
	<i>C.zanzibarica</i>	<i>C. micans</i>	<i>C. spectabilis</i>
Leptóteno	89,19	15,13	0
Zigóteno			
Paquíteno	0	7,65	1,60
Diplóteno	0,29	10,10	64,28
Diacinese	0,73	45,56	8,3
Metáfase I	1,63	4,04	2,72
Anáfase I	2,96	1,01	1,33
Telófase I	0,29	3,03	3,28
Prófase II	1,22	0	0
Metáfase II	0,81	3,03	4,11
Anáfase II	0,6	1,01	0,77
Telófase II	0,5	2,02	2,72
Tétrade	0	6,06	0,77
Tríade	0,5	2,02	1,60
Indefinida	1,63	-	8,85

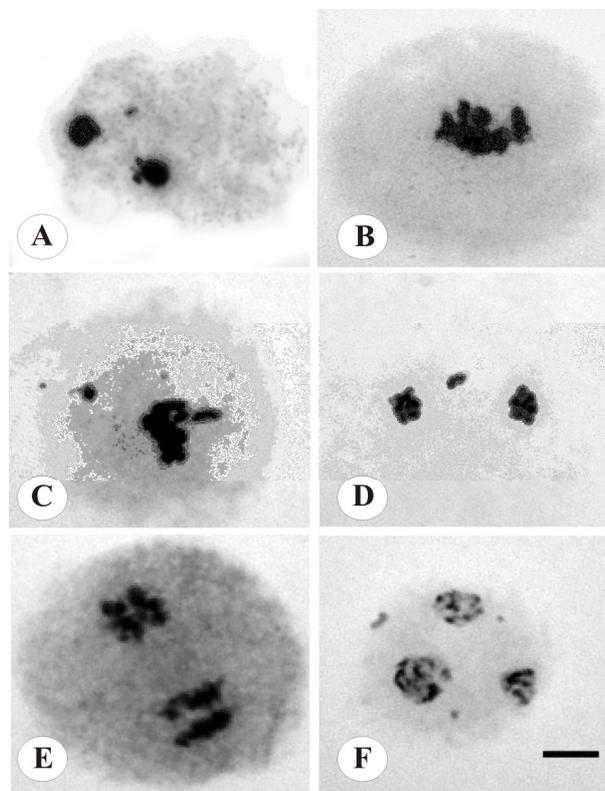


FIGURA 3 Anormalidades meióticas em *Crotalaria zanzibarica* (n = 8). (A) Núcleos condensados; (B) cromossomos pegajosos; (C) metáfase I e (D) prófase II com cromossomos atrasados; (E) irregularidade do fuso meiótico; (F) tríade com micronúcleo. Barra: 5 μ m.

Na espécie *C. micans* foram detectadas cerca de 8% de células-mãe do grão de pólen irregulares (Tabela 3). Seus meiócitos iniciais irregulares apresentaram cromossomos pegajosos (Figura 4A). Cromossomos atrasados e ou perdidos foram observados nos meiócitos em metáfase I (Figura 4B). Este tipo de anormalidade e também pontes foram relatados por Almada et al. (2006) nas anáfases I e II. Já nas fases metáfase II e telófase II foi observada irregularidade

do fuso meiótico (Figura 4C-D), e, nesta última fase, ocorreu assincronismo na descondensação do material genético.

Das espécies estudadas, apenas *C. micans* apresentou migração de material genético de uma célula para outra, evidenciando a ocorrência de citomixia (Figuras 4E-I), fenômeno que correspondeu a 16% do total das irregularidades observadas nessa espécie. A citomixia foi observada apenas na prófase I, correspondendo a 11,08% das irregularidades observadas nos meiócitos em leptóteno/zigóteno e 4,92% das irregularidades em paquíteno. Isto corrobora o relato de que esse fenômeno ocorre, predominantemente, durante a prófase I, entretanto, discorda da predominância de ocorrência durante o paquíteno (Belluca et al., 2003; Falistocco et al., 1995; Sidorchuk et al., 2004; Wang et al., 2002).

A ocorrência deste fenômeno tem sido relatada nas famílias Fabaceae, Brassicaceae, Poaceae, Apocynaceae, Liliaceae e Rutaceae (Belluca et al., 2003; Bosco & Mariani, 2005; Falistocco et al., 1995; Feijó & Pais, 1989; Souza & Pagliarini, 1997; De & Sharma, 1983).

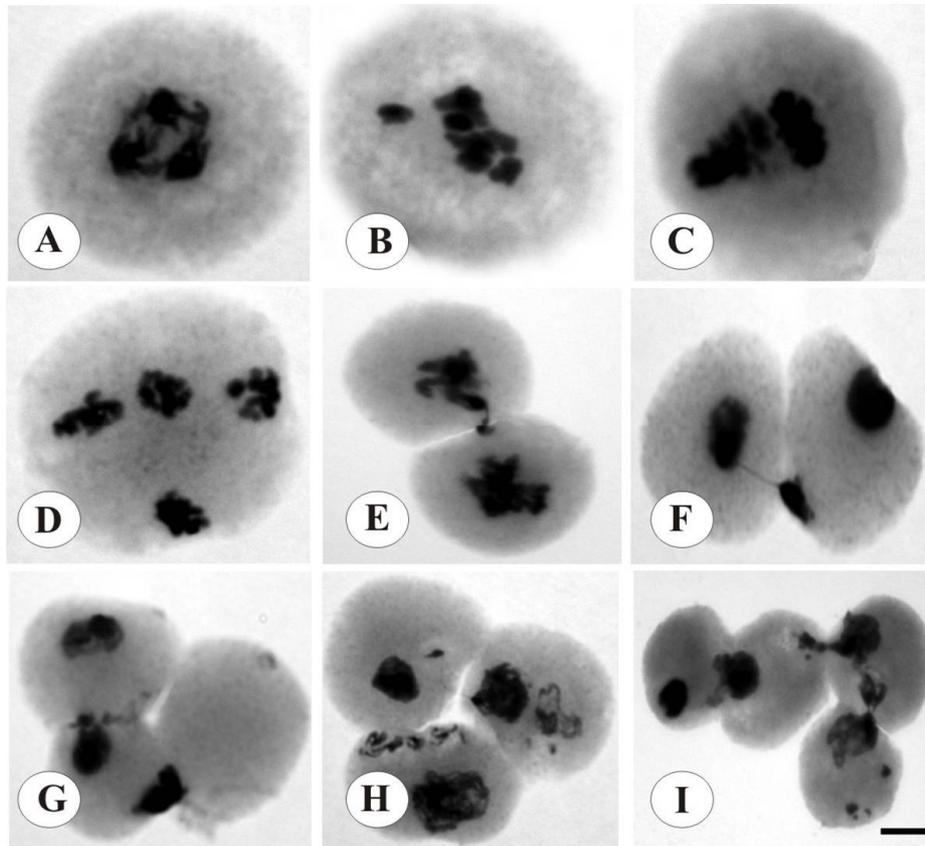


FIGURA 4 Anormalidades meióticas em *Crotalaria micans* (n = 8). (A) Cromossomos pegajosos; (B) metáfase II com cromossomo atrasado; (C) metáfase II e (D) telófase II assincrônica com fusos irregulares (E) citomixia entre meiócitos no início do paquíteno; (F) meiócitos em zigóteno com ponte cromatínica simples; (G) migração total de cromatina de um meiócito para outro em prófase I; (H) migração de cromatina entre três ou (I) mais células na prófase I. Barra: 5 μ m.

Em algumas células citomíticas da espécie *C. micans* a migração de cromatina foi completa enquanto em outras a migração foi parcial permanecendo

na célula doadora parte do material genético (Figura 4G). Em outros casos, a conexão citoplasmática ocorreu entre várias células ao mesmo tempo, sendo que umas funcionavam como meiócitos doadores e outras, como receptores. (Figuras 4H-I). Alguns autores sugerem que a migração de cromatina e de cromossomos não é aleatória e sim direcional. Por exemplo, Falistocco et al. (1995) observaram que, em *Dactylis*, a citomixia sempre ocorria de uma célula doadora para uma célula receptora e que, em muitos casos, também ocorria a migração completa ou quase total do material genético e não só entre duas, mas entre várias células ao mesmo tempo.

A citomixia na meiose pode ter implicações evolutivas importantes, na medida em que pode levar à formação de gametas com desbalanceamento cromossômico, inclusive com número não reduzido. No caso de esses gametas serem viáveis, irão dar origem a plantas aneuplóides ou poliplóides. Essa possibilidade foi sugerida por Belluca et al. (2003) trabalhando com *Medicago sativa*. Alta viabilidade de grãos de pólen (87,1% a 95,1%) de plantas citomíticas de *Dactylis* foi mostrada por Falistocco et al. (1995), evidenciando que a citomixia pode ser potencialmente importante na produção de grãos de pólen não reduzidos ($2n$).

A espécie *C. spectabilis* apresentou aproximadamente 12% dos seus meiócitos com algum tipo de irregularidade. Foi observada alta porcentagem de diplótenos irregulares (64,28%) (Tabela 3), onde foram encontrados multivalentes (Figura 5A). Também observou-se cromossomos pegajosos (Figura 5B); cromossomos com segregação precoce em metáfase I (Figura 5C); cromossomos atrasados em prófase II (Figura 5D); irregularidade do fuso meiótico em metáfase II (Figura 5E) e em telófase II, também com assincronismo cromossômico e micronúcleo (Figuras 5F).

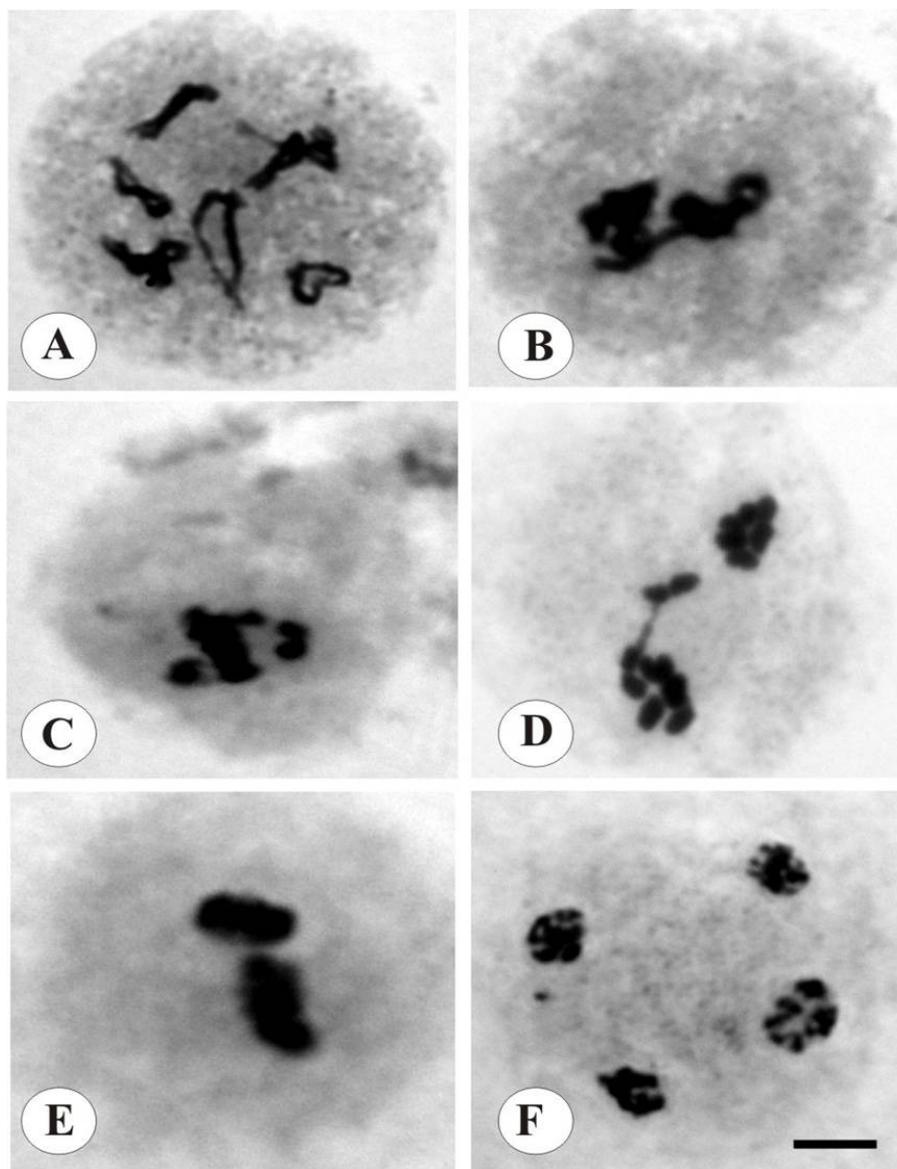


FIGURA 5 Anormalidades meióticas em *Crotalaria spectabilis* (n = 8). (A) Diplóteno com multivalentes; (B) cromossomos pegajosos; (C) diplóteno com; (D) cromossomos atrasados em prófase II; (E) irregularidade do fuso em metáfase II e (F) em telófase II assincrônica, com micronúcleo. Barra: 5 μ m.

Almada et al. (2006) não detectaram micronúcleos em telófases nas espécies argentinas analisadas, apesar de terem encontrado cromossomos atrasados e ou perdidos e pontes, sendo todas as tétrades normais.

Como visto, a porcentagem total de anormalidades é considerável, com cada espécie tendo um tipo predominante de irregularidade. Dos meiócitos anormais de *C. zanzibarica*, a maior parte se encontrava com o núcleo fortemente condensado nas fases iniciais da meiose. Já *C. spectabilis* e *C. micans* apresentaram multivalentes, sendo que em *C. micans* também foi constatado o fenômeno da citomixia (Tabela 3). Entretanto, isto não se refletiu nos altos índices meióticos encontrados: *C. zanzibarica*, com 92,19%, *C. micans*, com 91,32% e *C. spectabilis*, com 88,18%.

Por outro lado, a germinação dos grãos de pólen das espécies analisadas foi baixa, tendo os testes de viabilidade polínica por coloração FDA e TTC-50% mostrado resultados próximos a este, indicando baixa viabilidade polínica (Tabela 4) (Figura 6). Já os testes de coloração com a solução Alexander, tanto em material fixado quanto *in natura*, mostraram alta porcentagem de grãos de pólen viáveis, seguidos pelo teste com TTC-5% (Tabela 4) (Figura 6). Isso poderia ser explicado pelo fato de que a solução Alexander e o TTC-5% não terem sido capazes de detectar a baixa viabilidade polínica demonstrada no teste de germinação.

TABELA 4 Porcentagem de viabilidade polínica determinada por testes de coloração (VP %) e de germinação *in vitro* (G %) de três espécies do gênero *Crotalaria* L.

Espécies	VP% - Coloração					G%
	AF ¹	AI ²	TTC 5% ³	TTC 50% ⁴	FDA ⁵	
<i>C. zanzibarica</i>	98,6	96,4	56,8	7	7,18	6,93
<i>C. micans</i>	98	98,7	57,2	13,7	14,8	14,52
<i>C. spectabilis</i>	99,3	98,7	62	11,4	28,42	17,4

¹ – solução de Alexander com grãos de pólen fixados;

² – solução de Alexander com grãos de pólen *in natura*;

³ – solução de tetrazólio a 5%;

⁴ – solução de tetrazólio a 50%;

⁵ – solução com diacetato de fluoresceína.

Uma provável explicação para a baixa viabilidade polínica seriam essas irregularidades meióticas observadas, que estariam afetando a viabilidade dos grãos de pólen destas espécies por causa de alterações no número cromossômico ou ainda devido a alterações pós-meióticas. Por outro lado, considerando que essas espécies produzem grande quantidade de sementes, tanto em populações naturais como em cultivo, essa baixa viabilidade deve ser compensada pela grande quantidade de grão de pólen observada.

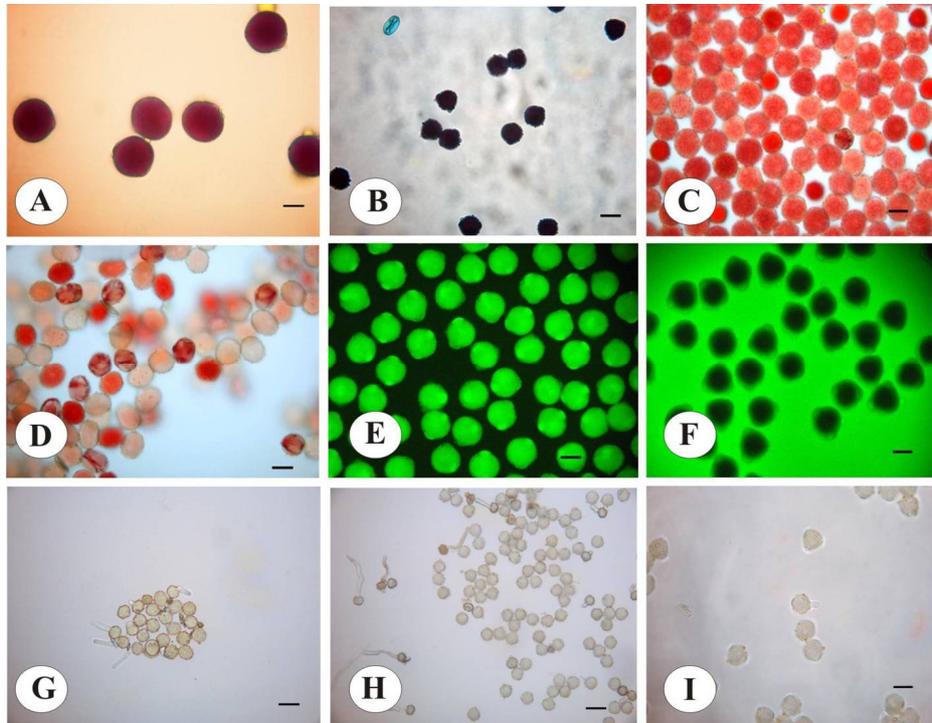


FIGURA 6 Viabilidade e germinação de grãos de pólen de *Crotalaria*. (A) Grãos de pólen fixados de *C. zanzibarica* em solução de Alexander, microsporócitos com citoplasma fortemente corado (roxo) e inteiro são viáveis, já aqueles com citoplasma fracamente corado (verde) e não-inteiro são inviáveis. Barra: 10 μm . (B) Grãos de pólen *in natura* de *C. spectabilis* em solução de Alexander. Barra: 20 μm . (C) Grãos de pólen *in natura* de *C. micans* em solução de tetrazólio (TTC) a 5% e (D) a 50%, microsporócitos com coloração vermelha carmim são viáveis e aqueles incolores, inviáveis. Barra: 20 μm . (E) Grãos de pólen *in natura* de *C. spectabilis* em solução de diacetato de fluoresceína (FDA), microsporócitos fluorescentes são viáveis, (F) aqueles que não fluorescem são inviáveis. Barra: 10 μm . (G) Grãos de pólen germinados de *C. micans*, (H) *C. spectabilis* e (I) *C. zanzibarica*.

4 CONCLUSÃO

As espécies *Crotalaria zanzibarica*, *Crotalaria micans* e *Crotalaria spectabilis* têm comportamento meiótico irregular, com anormalidades típicas em cada uma delas.

A baixa viabilidade dos grãos de pólen nas três espécies é explicada pelas anormalidades observadas no ciclo meiótico.

Os testes de viabilidade polínica por coloração com diacetato de fluoresceína (FDA) e solução de tetrazólio (TTC) a 50% são os mais indicados para este tipo de avaliação em espécies do gênero *Crotalaria* L.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELLUCA, M.; ROSCINI, C.; MARIANI, A. Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. **Journal of Heredity**, Cary, v.94, n.6, p.512-516, Nov. 2003.

BOULTER, D.; DERBYSHIRE, E.; FRAHM-LELIVELD, J.A.; POLHILL, R.M. Observations on the cytology and seed-proteins of various African species of *Crotalaria* L. (Leguminosae). **New Phytologist**, Cambridge, v.69, n.1, p.117-131, 1970.

DE, M.; SHARMA, A.K. Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (Linn.) Alston. **Cytologia**, Tokyo, v.48, n.1, p.201-207, 1983.

FALISTOCCO, E.; TOSTI, N.; FALCINELLI, M. Cytomixis in pollen mother cells of diploid *Dactylis*, one of origins of 2n gametes. **Journal of Heredity**, Cary, v.86, n.6, p.448-453, Nov./Dec.1995.

FEIJÓ, J.A.; PAIS, S.S. Cytomixis in meiosis during the microsporogenesis of *Ophrys lutea*: an ultrastructural study. **Caryologia**, Cary, v.42, n.1, p.37-48, Jan./Mar. 1989.

FLORES, A.S. **Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) no Brasil. 2004.** 213p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FLORES, A.S.; CORRÊA, A.A.M.; FORNI-MARTINS, E.R.; TOZZI, A. M.G.A. Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.151, n.2, p.271-277, June 2006.

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. Part 2, p. 427-463.

LYSÁK, M.A.; BERR, A.; PECINKA, A.; SCHMIDT, R.; MCBREEN, K.; SCHUBERT, I. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**, Washington, v.103, n.13, p.5224-5229, Mar. 2006.

LÖVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behaviour of brazilian wheats. **Agronomy Journal**, Madison, v.43, n.1, p.72-76, Jan. 1951.

MANGOTRA, R.; KOUL, A. Base number in the genus *Crotalaria*: evidences from meiosis. **The Nucleus**, Oxford, v.34, p.158-161, 1991.

MEDINA, J.C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959. 913p.

MONDIN, M. **Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e hibridação *in situ* fluorescente (FISH)**. 2003. 115p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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.

PALOMINO, G.; VÁZQUEZ, R. Cytogenetic studies in mexican populations of species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). **Cytologia**, Tokyo, v.56, n.3, p.343-351, 1991.

POLHILL, R.M. ***Crotalaria* in Africa and Madagascar**. Rotterdam: A.A. Balkeama, 1982. 389p.

SIDORCHUK, Y.V.; DEINEKO, E.V.; SHUMNYI, V.K. Cytomixis in pollen mother cells of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants. **Doklady Biological Science**, New York, v.394, n.1/6, p.47-50, Jan. 2004.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: E. Arnold, 1971. 216p.

SOUZA, A.M.; PAGLIARINI, M.S. Cytomixis in *Brassica napus* var. *oleifera* and *Brassica campestris* var. *oleifera* (Brassicaceae). **Cytologia**, Tokyo, v.62, n.1, p.25-29, 1997.

VICCINI, L.F.; PIERRE, P.M.O.; PRAÇA, M.M.; COSTA, D.C.S.; ROMANEL, E.C.; SOUSA, S.M.; PEIXOTO, P.H.P.; SALIMENA, F.R.G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae), **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v.256, n.1/4, p.171-178, Nov. 2006.

VERMA, R.C.; RAINA, S.N. Cytogenetics of *Crotalaria*: II. Males meiosis in 8 species of *Crotalaria*. **Cytologia**, Tóquio, v.45, n.1/2, p.297-306, 1980.

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

WANG, X.Y.; NIE, X.W.; GUO, G.Q.; PAN, Y.F.; ZHENG, G.C. Ultrastructural characterization of the cytoplasmic channel formation between pollen mother cells of david lily. **Caryologia**, Tokyo, v.55, n.2, p.161-169, 2002.

WINDLER, D. Chromosome number for native North American unifoliate species of *Crotalaria* (Leguminosae). **Brittonia**, Bronx, v.26, n.2, p.172-176, 1974.

CAPÍTULO 4

Palinologia de espécies das subfamílias Caesalpinioideae e Faboideae (Fabaceae)

K. Ferreira¹, G.A. Torres¹, S.M. Sousa², L.C. Davide¹

¹Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, CEP 37200-000,
Lavras, MG, Brasil

²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, CEP 36036-
900, Juiz de Fora, MG, Brasil

Correspondência com o autor: Tel: (35) 3829-1365; Fax: (35) 3829-1341.
E-mail: katia.lavras@ig.com.br (K. Ferreira)

RESUMO

A família Fabaceae compreende três grandes subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. As duas últimas parecem representar linhagens monofiléticas, enquanto Caesalpinioideae é considerada parafilética e mais primitiva. As três subfamílias apresentam espécies economicamente importantes, utilizadas no paisagismo, na medicina popular e na recuperação de áreas degradadas. No presente estudo, informações palinológicas inéditas de treze espécies de Caesalpinioideae dos gêneros *Cassia*, *Senna* e *Peltophorum* e três espécies de Faboideae do gênero *Crotalaria* foram usadas para inferências filogenéticas. Os grãos de pólen foram analisados sob microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Dentre as espécies da tribo Cassieae, *Cassia fistula* foi a única com grão de pólen do tipo oblato-esferoidal. A maioria das espécies do gênero *Senna* teve a endoexina mais espessa do que a ectoexina. *S. alata* foi a espécie que apresentou o colpo mais curto com relação às outras espécies de sua tribo, sendo que os colpos longos das demais espécies diferiram em largura, profundidade e tipo de extremidades. Com relação aos grãos de pólen da tribo Cassieae, apenas *Cassia fistula* e *S. alata* apresentaram tamanho médio; todos foram isopolares e tricolporados, com exceção de *S. rugosa*. Entre as espécies da tribo Crotalarieae, *C. micans* foi a que diferiu das outras duas com relação ao tipo polínico e ao tamanho do grão de pólen e da abertura. As três espécies de *Crotalaria* tiveram exina reticulada com muros finos, rasos, como se apresentassem pequenas depressões. As características polínicas analisadas apresentaram polimorfismo útil para análise filogenética. A árvore consenso, apenas parcialmente resolvida, revelou falta de consistência no agrupamento do gênero *Senna*.

*Comitê Orientador: Dra Giovana Augusta Torres– UFLA (Orientadora); Dra Lisete Chamma Davide UFLA (Coorientadora)

ABSTRACT

The family Fabaceae comprises three major subfamilies: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae. The last two seem to represent monophyletic lineage, while Caesalpinioideae is considered paraphyletic and more primitive. The three subfamilies have species economically important, used in landscaping, popular medicine and restoration of degraded areas. This study reports new pollen morphology data of thirteen Caesalpinioideae species belonging to the genera *Cassia*, *Senna* and *Peltophorum* and three Faboideae species belonging to the genus *Crotalaria*. These data were used for phylogenetic analysis. Pollen grains were analyzed under light and electronic (transmission and scanning) microscopy. Amongst the species of the tribe Cassieae, *Cassia fistula* was the only one with oblate-spheroidal pollen grain type. Most of the *Senna* species had the endexine thickest than the ectexine. *S. alata* showed the shortest colpo in its tribe. Long colpus of the other species were differentiated based on their width, depth and type of extremities. In Cassiae tribe, only *Cassia fistula* and *S. alata* had average size pollen grains, while all of them, but *S. rugosa*, had isopolar and triaperturate pollen. In Crotalariaeae tribe, *C. micans* was the only one differing from the other two with regard to the pollen type, aperturate and pollen size. All three species had reticulate exine with fine, flat walls, with a depression-like appearance. Pollen data showed variability useful for phylogenetic analysis. The consensus tree unrevealed low consistency in *Senna* grouping.

* Guidance Committee: Dra. Giovana Augusta Torres - UFLA (Major Professor); Dra. Lisete Chamma Davide UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Fabaceae é a terceira maior família de plantas com flores, com, aproximadamente, 720 gêneros e mais de 18.000 espécies, variando de herbáceas anuais a árvores tropicais. É encontrada em habitats que vão desde florestas chuvosas a desertos, e de terras baixas aos Alpes, sendo seus centros de diversidade as regiões tropicais e subtropicais (Doyle & Luckow, 2003). Devido à importância econômica e ecológica das leguminosas, o conhecimento da evolução e da sistemática dessa família tem sido investigado por amplo espectro de disciplinas da área básica e aplicada, especialmente a agricultura (Wojciechowski, 2003).

Esta família é dividida, com base em caracteres morfológicos, particularmente os florais, em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Doyle & Luckow, 2003; Tucker, 2003).

Faboideae é a maior subfamília, com 30 tribos, 476 gêneros e aproximadamente 14 mil espécies, dentre as quais se encontram os feijões e as *Crotalaria* (Lewis et al., 2005). Análises moleculares (Doyle, 1995; Doyle et al., 2000; Kajita et al., 2001) e evidências morfológicas (Chappill, 1995) das leguminosas demonstram que esta subfamília forma um grupo monofilético relacionado à Caesalpinioideae. Dentro da subfamília Faboideae encontram-se os maiores grupos monofiléticos ou clados, como o clado genistoide, o qual inclui as tribos: Genisteae, Thermopsidae, Crotalariae, Podalyrieae e Sophoreae (Doyle et al., 2000; Polhill, 1981).

O gênero *Crotalaria*, tribo Crotalariae, possui aproximadamente 600 espécies (Polhill, 1982), das quais 31 são nativas do Brasil e 11 introduzidas (Flores, 2004), sendo dividido em oito seções: *Grandiflorae*, *Crhysocalycicae*, *Hedriocarpae*, *Geniculatae*, *Calycinae*, *Crotalaria*, *Schizostigma* e *Dispermae*

(Bisby, 1970; Bisby, 1973; Bisby & Polhill; 1973). Essas espécies ocorrem ambientes abertos, como cerrados e campos, podendo estar associadas a bordas de mata (Flores, 2004).

Caesalpinioideae compreende cerca de 170 gêneros e, aproximadamente, 3.000 espécies (Tucker, 2003). Apresenta grande diversidade na forma floral e ontogenia e, nas análises filogenéticas, emerge como grupo irmão das demais Fabaceae (Bruneau et al., 2001; Doyle, 1995; Doyle et al., 2000). É usualmente dividida em quatro ou cinco tribos: Cercideae, Caesalpineae, Cassieae, e Detarieae, com Macrolobieae (derivada de Detarieae), recentemente descrita (Tucker, 2003).

Na tribo Cassieae, muita atenção tem sido dada às investigações taxonômicas do gênero *Cassia sensu lato*, o qual foi dividido em três gêneros: *Cassia sensu stricto*, *Chamaecrista* Moench e *Senna* Mill. (Boonkerd et al., 2005). Apesar da similaridade desses gêneros com relação a caracteres morfológicos, de acordo com Biondo et al. (2005), esta divisão de *Cassia sensu lato* é suportada por resultados obtidos em estudos com proteínas de sementes (Guareeb et al., 1999), caracteres vegetativos e reprodutivos (Dulberger et al., 1994; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger; 1988; Irwin & Barneby, 1981; Irwin & Barneby, 1982; Owens & Lewis, 1989), características ontogenéticas (Tucker, 1996), sistemática molecular (Bruneau et al., 2001; Doyle et al., 2000) e características citogenéticas (Biondo et al, 2005abc; Goldblatt, 1981). No entanto, espécies de *Senna* ainda são classificadas em *Cassia s.l.* (Boonkerd et al., 2005). O gênero *Senna* Mill. tem cerca de 260 espécies distribuídas em seis seções: *Psilorhegma*, *Chamaefistula*, *Senna*, *Peiransia*, *Paradyction* e *Astroites*, sendo considerado parafilético (Irwin & Barneby, 1981; Irwin & Barneby, 1982).

Inferências filogenéticas em todos os níveis taxonômicos da família Fabaceae têm sido feitas a partir de dados morfológicos e, especialmente

moleculares. Apesar do grande número de respostas derivadas das análises moleculares, muitas questões na filogenia das leguminosas permanecem não resolvidas, tanto ao nível dos grandes clados, como ao nível de espécies, como, por exemplo, a definição do gênero *Cassia s.l.* (Wojciechowski, 2003).

A palinologia tem sido utilizada como um elemento potencial a mais para inferências filogenéticas, principalmente no nível de espécies. Sauquet & Cantrill (2007) utilizaram caracteres palinológicos em estudos de filogenia de espécies de Proteaceae. Kaplan (2008) analisou espécies do gênero *Paronychia* (Caryophyllaceae) e Doyle & Thomas (2007) testaram a significância da palinologia para a filogenia de *Annonaceae*. Estes autores relatam que esse tipo de caráter tem significância taxonômica e confirmam o valor da palinologia no reconhecimento das relações filogenéticas.

Dentre as espécies estudadas no presente trabalho, apenas algumas do gênero *Senna* e outras ainda classificadas como *Cassia sensu lato* tiveram seus tipos polínicos classificados por meio da microscopia fotônica (Biondo et al., 2005; Miranda & Andrade, 1984). Portanto, objetiva-se descrever e comparar a morfologia polínica de treze espécies de Caesalpinioideae dos gêneros *Cassia*, *Senna* e *Peltophorum* e três espécies de Faboideae do gênero *Crotalaria*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Exsicatas do material botânico listado na Tabela 1 foram catalogadas no Herbário da Universidade Federal de Lavras (ESAL). Duplicatas desse material foram enviadas ao Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB), onde foram identificadas de acordo com o determinador Dr. Haroldo Cavalcante de Lima.

2.2 Análise polínica

Logo após a antese, as anteras das espécies descritas foram coletadas imediatamente e fixadas em Carnoy (3 metanol:1 ácido acético), sendo armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para o estudo em microscopia fotônica, o material polínico foi preparado segundo o método acetolítico de Erdtman (1952). As lâminas foram avaliadas em microscópio de campo claro (Olympus BX60), equipado com microcâmera (Optronics) para digitalização.

Mensurações aleatórias de 50 grãos de pólen por espécie foram realizadas com o programa Sigma ScanPro 4.0. Foram obtidas as medidas do eixo polar (P) e do diâmetro equatorial (E), sempre que os grãos de pólen se apresentaram em vista equatorial (25 grãos); do diâmetro equatorial (D) e do lado do apocolpo (d,) quando em vista polar (25 grãos); da espessura da exina e do comprimento, da largura e da margem do colpo e da abertura. Foram estabelecidas as relações P/E, por meio das quais foi classificado o tipo polínico de acordo com Punt et al. (1999) e o índice da área polar (d/D), pelo qual foi classificado o tamanho da área polar de acordo com Faegri & Iversen (1966). O

tamanho do grão de pólen (muito grande, grande e médio) foi baseado na medida do eixo polar (P), na vista equatorial. Todas as medidas foram obtidas no prazo máximo de sete dias após a acetólise, a fim de se evitar alterações nas dimensões dos grãos de pólen (Salgado-Labouriau, 1973). A terminologia adotada foi a de Punt et al. (1999).

Para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), os grãos de pólen não acetolisados foram preparados de acordo com o protocolo padrão do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da UFLA, com algumas modificações. Os espécimes foram lavados três vezes, por 10 minutos, em tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas (MEV) ou 4 horas (MET), à temperatura ambiente.

Para análise em MEV, após este período, os espécimes foram lavados por três vezes, desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes), levados ao aparelho de ponto crítico (CDP 030) e de evaporador de ouro (SCD 050), sendo analisados em aparelho MEV-LEO-EVO40.

Para análise em MET, os espécimes foram lavados por três vezes, contrastados em solução a 0,5% de acetato de uranila (12 horas, a 4°C), lavados novamente e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes).

As anteras foram emblocadas em resina Spurr. Anteras espessas ou com grande quantidade de grãos de pólen, foram previamente submetidas ao ponto crítico, sendo os grãos de pólen retirados e acrescentados em solução de agarose 2%. Em ultramicrotomo foram realizadas secções semifinas (0,5-1,5 μ m), coradas com azul de toluidina e ultrafinas (100 nm), contrastadas em solução a 2% de acetato de uranila e em solução a 3% de citrato de chumbo (3 a 10

minutos em cada solução). O material foi analisado em aparelho MET ZEISS EM 109.

Para análise filogenética, as três espécies de *Crotalaria*, subfamília Faboideae, foram consideradas como *outgroup*, enquanto o *ingroup* foi constituído pelas treze espécies da subfamília Caesalpinioideae (Tabela 1) Foram utilizados 16 taxa e selecionados 17 caracteres palinológicos, dos quais 12 foram binários e 5 multiestados (Anexo 1A e 1B). Os caracteres multiestados foram primeiramente tratados como não-ordenados, e, posteriormente, desmembrados em caracteres binários (ausência/presença), com o objetivo de testar a resolução das árvores. O conjunto de dados palinológicos (matriz 1 e 2) foi submetido a uma rotina padrão (valores *default*) de busca heurística com o programa PAUP versão 3.1.

TABELA 1 Material botânico da família Fabaceae com seu respectivo local de coleta, número de acessos coletados (NA) e número de registro no ESAL.

SUBFAMÍLIA	TRIBO	ESPÉCIE	ORIGEM	NA	ESAL
Caesalpinioideae <i>ingroup</i>	Caesalpineae	<i>Peltophorum dubium</i>	Lavras ¹	1	22.071
		<i>Cassia fistula</i> L	Lavras	5	20.428
		<i>Senna macranthera</i> (Collad.) I. & B. var. <i>macranthera</i>	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>	Lavras	3	20.425
		<i>Senna cernua</i> (Balbis) I. & B.	São João del – Rei ²	5	20.970
		<i>Senna corymbosa</i> (Lam.) I & B.	Lavras	1	22.069
		<i>Senna pendula</i> (Willd.) I. & B.	Lavras	3	20.463
		<i>Senna multijuga</i> (L.C. Rich.) I. & B.	Lavras	5	20.466
		<i>Senna alata</i> (L.) Roxburgh	Perdões ³	3	22.065
		<i>Senna siamea</i> (Lam.) I. & B.	Lavras	1	20.465
		<i>Senna silvestris</i> (Vell.) I. & B. var. <i>bifaria</i> .	Lavras	5	20.429
		<i>Senna spectabilis</i> (DC.) I. & B.	Lavras	3	20.462
Faboideae <i>outgroup</i>	Crotalarieae	<i>Crotalaria micans</i> Link	Lavras	10	22.070
		<i>Crotalaria spectabilis</i> Roth	Ijaci ⁴	5	22.066
		<i>Crotalaria zanzibarica</i> Benth	Ijaci	10	22.067

¹ - 21°14'43"S (Latitude) e 44°59'59"W (Longitude); ² - 21°08'08"S (Latitude) e 44°15'42"W (Longitude);

³ - 21°03'45"S (Latitude) e 45°03'45"W (Longitude); ⁴ - 21°11'15"S (Latitude) e 44°56'15"W (Longitude).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie representante da tribo Caesalpinieae, *Peltophorum dubium*, apresenta a razão do eixo polar sobre o diâmetro equatorial na vista equatorial (P/E) variando de 0,88-1,00 μm , com o grão de pólen sendo classificado como oblato esferoidal (Tabela 2) (Punt et al., 1999). A ectoexina é bem mais espessa que a endoexina, o que pode ser constatado tanto em microscopia de luz (Tabela 3), quanto em MET (Figuras 1). O grão de pólen apresenta colpo longo, raso, largo, de extremidades obtusas e com uma constrição mediana proeminente, sendo esta uma abertura longa e larga (Tabela 4 e 5) (Figuras 1B-C; 1E-F). Este é muito grande, isopolar, tricolporado, com âmbito circular e com área polar pequena (Tabela 5 e 6) (Figuras 1B). A exina é reticulada, formada por muros largos, simplescolumelados e de lúmens heterogêneos. Os muros do retículo são altos, largos e de superfície regular (Figura 1G).

Dentre as espécies da tribo Cassieae, *Cassia fistula* é a única que possui grão de pólen do tipo oblato-esferoidal. Já dentre as espécies do gênero *Senna*, duas apresentam grão de pólen do tipo prolato-esferoidal (P/E entre 1 e 1,14 μm), quatro espécies mostram grão de pólen subprolato (P/E entre 1,14 e 1,33 μm) e as outras cinco espécies, grão de pólen prolato (P/E entre 1,33 e 2 μm) (Tabela 2 e 5).

TABELA 2 Medidas (em μm) dos grãos de pólen em vista equatorial ($n = 25$). m = média aritmética; s_m = desvio padrão da média; P/E = relação entre a média do eixo polar e do eixo equatorial.

Espécies	Eixo polar		Diâmetro equatorial		P/E
	Faixa de variação	$m \pm s_m$	Faixa de variação	$m \pm s_m$	
<i>Peltophorum dubium</i>	73,71-87,83	80,66 \pm 2,73	81,53-93,81	86,82 \pm 2,53	0,93
<i>Cassia fistula</i>	47,17-61,34	53,08 \pm 2,08	53,39-73,05	61,92 \pm 2,71	0,86
<i>Senna macranthera macranthera</i>	60,41-79,06	72,07 \pm 3,27	57,38-75,37	66,42 \pm 2,99	1,09
<i>Senna rugosa</i>	81,94-98,83	91,31 \pm 3,73	76,41-88,53	79,96 \pm 1,4	1,14
<i>Senna splendida splendida</i>	66,38-81,72	74,84 \pm 3,01	48,31-66,89	56,45 \pm 2,7	1,28
<i>Senna cernua</i>	77,1-100,65	92,34 \pm 3,49	60,46-75,53	67,59 \pm 3,24	1,37
<i>Senna corymbosa</i>	60,19-72,15	67,17 \pm 2,94	42,7-56,08	49,15 \pm 2,97	1,37
<i>Senna pendula</i>	64,65-79,03	71,73 \pm 2,43	44,02-57,06	50,62 \pm 2,21	1,42
<i>Senna multijuga</i>	54,26-66,83	61,56 \pm 2,48	37,5-52,14	45,31 \pm 2,94	1,36
<i>Senna alata</i>	51,17-65,48	57,3 \pm 2,59	46,04-55,91	51,31 \pm 2,25	1,12
<i>Senna siamea</i>	87,55-106,98	95,8 \pm 3,62	67,86-89,87	80,74 \pm 3,71	1,19
<i>Senna silvestris bifaria</i>	73,96-94,42	84,15 \pm 4,83	62,77-79,65	73,05 \pm 3,65	1,15
<i>Senna spectabilis</i>	60,91-74,92	68,98 \pm 2,62	45,09-57,58	52,74 \pm 2,55	1,31
<i>Crotalaria micans</i>	60,66-68,64	65,03 \pm 1,78	39,27-49,81	44,32 \pm 2,1	1,47
<i>Crotalaria spectabilis</i>	39,29-48,71	44,64 \pm 2,13	31,18-37,84	34,63 \pm 1,25	1,29
<i>Crotalaria zanzibarica</i>	39,62-47,98	42,7 \pm 1,5	30,81-40,14	36,48 \pm 1,84	1,17

TABELA 3 Média (em μm) das medidas das camadas da exina dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioidea e Faboideae (n= 25) e ornamentação da exina.

Espécies	Endoexina	Ectoexina	Exina	Tipo de exina
<i>Peltophorum dubium</i>	3,43	6,15	9,58	reticulada com muros lisos
<i>Cassia fistula</i>	1,92	1,91	3,84	lisa perfurada e verrugosa nos colpos
<i>Senna macranthera macranthera</i>	2,02	2,10	4,12	reticulada rugulada
<i>Senna rugosa</i>	2,10	2,16	4,26	reticulada rugulada
<i>Senna splendida splendida</i>	2,21	2,28	4,48	rugulada com perfurações
<i>Senna cernua</i>	1,73	2,11	3,84	microrreticulada
<i>Senna corymbosa</i>	1,72	1,83	3,55	granulada
<i>Senna pendula</i>	1,62	1,73	3,35	microrreticulada
<i>Senna multijuga</i>	1,74	1,81	3,56	reticulada rugulada
<i>Senna alata</i>	1,59	1,77	8,67	rugulada
<i>Senna siamea</i>	1,97	2,82	4,79	reticulada rugulada
<i>Senna silvestris bifaria</i>	2,20	2,58	4,78	rugulada
<i>Senna spectabilis</i>	1,84	1,92	3,76	granulada
<i>Crotalaria micans</i>	1,48	1,5	2,99	reticulada com depressões
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1,19	1,19	2,38	reticulada com depressões
<i>Crotalaria zanzibarica</i>	1,25	1,35	2,60	reticulada com depressões

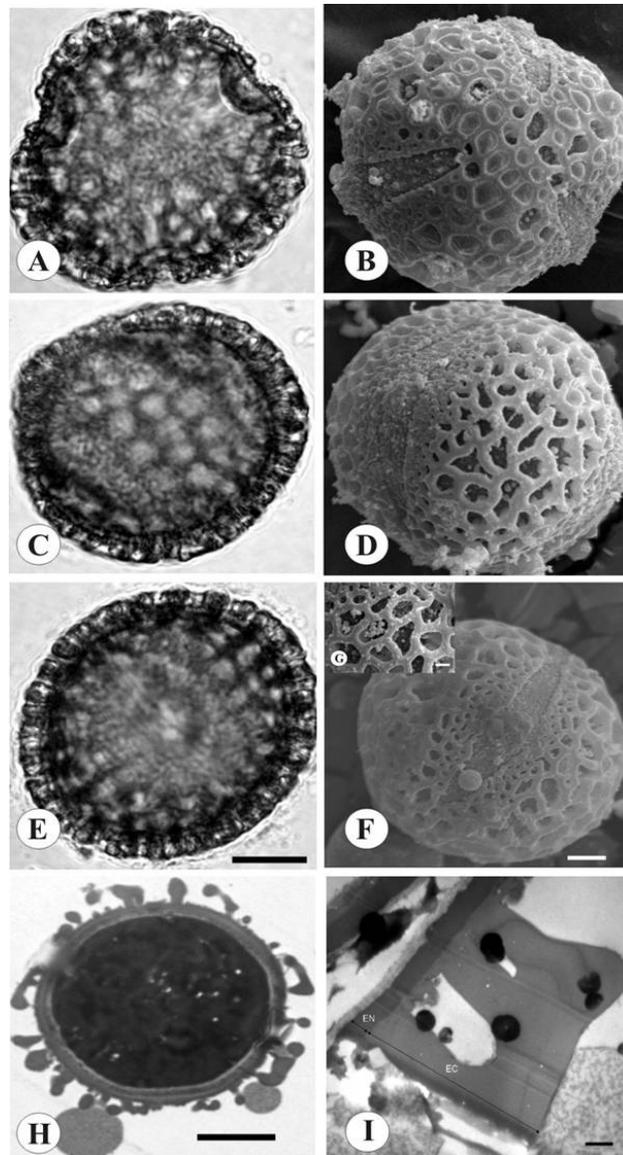


FIGURA 1 Descrição polínica de *Peltophorum dubium*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

TABELA 4 Média (em μm) das medidas dos colpos e das aberturas dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioideae e Faboideae (n= 25).

Espécies	Colpo			Abertura		
	Comprimento	Largura	Margem	Comprimento	Largura	Margem
<i>Peltophorum dubium</i>	53,20	4,98	3,77	21,84	6,72	6,08
<i>Cassia fistula</i>	40,31	2,19	1,93	10,45	2,25	1,93
<i>Senna macranthera macranthera</i>	60,51	3,17	2,41	14,11	9,09	5,05
<i>Senna rugosa</i>	-	5,80	2,45	20,97	3,23	4,25
<i>Senna splendidasplendida</i>	54,31	4,27	3,28	20,71	4,84	4,92
<i>Senna cernua</i>	66,19	3,54	3,74	21,59	4,59	5,43
<i>Senna corymbosa</i>	49,83	2,32	2,4	11,66	1,77	2,12
<i>Senna pendula</i>	54,24	3,18	2,20	21,15	4,16	4
<i>Senna multijuga</i>	44,16	3,99	2	14,79	3,86	2,7
<i>Senna alata</i>	32,33	3,46	1,95	15,81	4,48	4,67
<i>Senna siamea</i>	65,16	3,38	2,14	22,56	3,73	2,99
<i>Senna silvestris bifaria</i>	51,35	2,98	1,82	16,56	3,31	2,46
<i>Senna spectabilis</i>	47	2,97	1,84	18,11	2,33	2,39
<i>Crotalaria micans</i>	41,90	2,17	1,6	20,02	3,42	4,33
<i>Crotalaria spectabilis</i>	32,90	2,29	1,2	15,42	3,48	3,46
<i>Crotalaria zanzibarica</i>	30,67	3,26	1,67	13,32	3,95	2,83

TABELA 5 Caracterização morfológica dos grãos de pólen de espécies de Caesalpinioideae e Faboideae. P = proeminente; NP = não-proeminente.

Espécies	Tamanho	Tipo polínico	Área apertural	Âmbito
<i>Peltophorum dubium</i>	muito grande	oblato-esferoidal	P	circular
<i>Cassia fistula</i>	médio	oblato-esferoidal	NP	triangular
<i>Senna macranthera macranthera</i>	grande	prolato-esferoidal	NP	triangular
<i>Senna rugosa</i>	muito grande	subprolato	NP	quadrangular
<i>Senna splendida splendida</i>	grande	subprolato	NP	circular
<i>Senna cernua</i>	muito grande	prolato	P	subtriangular
<i>Senna corymbosa</i>	grande	prolato	NP	subcircular
<i>Senna pendula</i>	grande	prolato	P	circular
<i>Senna multijuga</i>	grande	prolato	P	subcircular
<i>Senna alata</i>	médio	prolato-esferoidal	P	triangular
<i>Senna siamea</i>	muito grande	subprolato	P	subcircular
<i>Senna silvestris bifaria</i>	muito grande	subprolato	P	circular
<i>Senna spectabilis</i>	grande	prolato	P	subcircular
<i>Crotalaria micans</i>	grande	prolato	P	subcircular
<i>Crotalaria spectabilis</i>	médio	subprolato	P	subcircular
<i>Crotalaria zanzibarica</i>	médio	subprolato	P	subcircular

TABELA 6 Medidas (em μm) dos grãos de pólen em vista polar (n = 25). m = média aritmética; s_m = desvio padrão da média; índice de área polar (IAP = d/D).

Espécies	Lado do apocolpo (d)		Diâmetro equatorial (D)		IAP
	Faixa de variação	m \pm s_m	Faixa de variação	m \pm s_m	
<i>Peltophorum dubium</i>	16,77-29,78	22,57 \pm 2,67	49,68-61,21	57,01 \pm 2,34	0,40
<i>Cassia fistula</i>	7,58-12,86	10,58 \pm 1,43	30,88-45,59	17,92 \pm 3,22	0,28
<i>Senna macranthera macranthera</i>	8,17-15,17	10,22 \pm 1,10	44,14-60,19	49,78 \pm 3,34	0,21
<i>Senna rugosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Senna splendida splendida</i>	11,93-17,76	14,04 \pm 1,14	53,72-61,49	58,25 \pm 1,61	0,24
<i>Senna. cernua</i>	16,26-26,14	20,52 \pm 1,23	40,02-54,5	46,84 \pm 2,23	0,44
<i>Senna corymbosa</i>	9,49-15,66	12,46 \pm 1,10	48,59-57,18	52,67 \pm 1,65	0,24
<i>Senna pendula</i>	14,62-18,82	16,72 \pm 0,85	51,85-58,87	55,10 \pm 1,15	0,30
<i>Senna multijuga</i>	10,28-19,38	13,75 \pm 1,6	40,80-50,38	45,88 \pm 1,96	0,30
<i>Senna alata</i>	10,49-21,46	14,37 \pm 1,64	31,86-41,92	36,53 \pm 2,15	0,39
<i>Senna siamea</i>	10,81-21,37	14,80 \pm 2,45	50,9-68,37	59,49 \pm 2,32	0,28
<i>Senna silvestris bifaria</i>	24,4-33,95	28,99 \pm 1,98	52,1-33,95	56,66 \pm 1,43	0,51
<i>Senna spectabilis</i>	9,41-16,27	15,25 \pm 1,32	37,54-44,55	42,53 \pm 1,98	0,31
<i>Crotalaria micans</i>	9,87-18,54	13,65 \pm 1,69	32,79-40,67	36,09 \pm 1,67	0,38
<i>Crotalaria spectabilis</i>	10,45-18,76	13,43 \pm 1,48	29,38-41,03	36,90 \pm 2,71	0,36
<i>Crotalaria zanzibarica</i>	9,18-13,66	10,85 \pm 1,17	25,55-33,7	30,65 \pm 1,71	0,35

Para todas as espécies do gênero *Senna* (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, 12 e 13) a ectoexina é mais espessa do que a endoexina, sendo que em *Cassia fistula* (Figura 11), as camadas da exina têm espessura semelhante (Tabela 3). *S. alata* foi a única espécie que apresentou colpo curto, com relação às outras espécies de sua tribo (Tabela 4), enquanto nas demais o colpo foi longo sendo diferenciado entre elas em relação à largura, à profundidade e ao tipo de extremidades.

Com relação aos grãos de pólen da tribo Cassieae, apenas os de *Cassia fistula* e de *S. alata* possuem tamanho médio e todos são isopolares e tricolporados, com exceção de *S. rugosa* (Tabela 5 e Figura 9). Nesta espécie foram observadas quatro aberturas e apenas um colpo contínuo e longo, ao redor de todo o grão de pólen, com aparente deposição de exina obstruindo algumas regiões. Isso pode estar relacionado com uma divisão do colpo, sugerindo que esta espécie pode estar em transição para o tipo de colpo de seu grão de pólen. Apenas nas espécies *S. silvestres bifaria* (Figura 13) e *S. cernua* (Figura 2) foram observadas áreas polares grandes, com todas as outras sendo pequenas ou muito pequenas.

A exina de *Cassia fistula* é lisa com perfurações, porém, sendo verrugosa nos colpos e suas margens (Figura 11G). *S. macranthera macranthera*, *S. rugosa* e *S. siamea* possuem exina reticulada, formada por muros largos, simplescolumelados e de lúmens heterogêneos (Figuras 8G, 9G e 6G). Em MEV, observa-se que o retículo, em algumas regiões, tem o aspecto de rúgula devido à redução do espaço entre os lúmens, como observado por Gonçalves-Esteves & Mendonça (2001) em espécies de restinga (Clusiaceae). O muro do retículo apresenta superfície lisa. *S. multijuga* também apresenta este tipo de ornamentação da exina, porém seus lúmens se parecem com perfurações (Figura 4G).

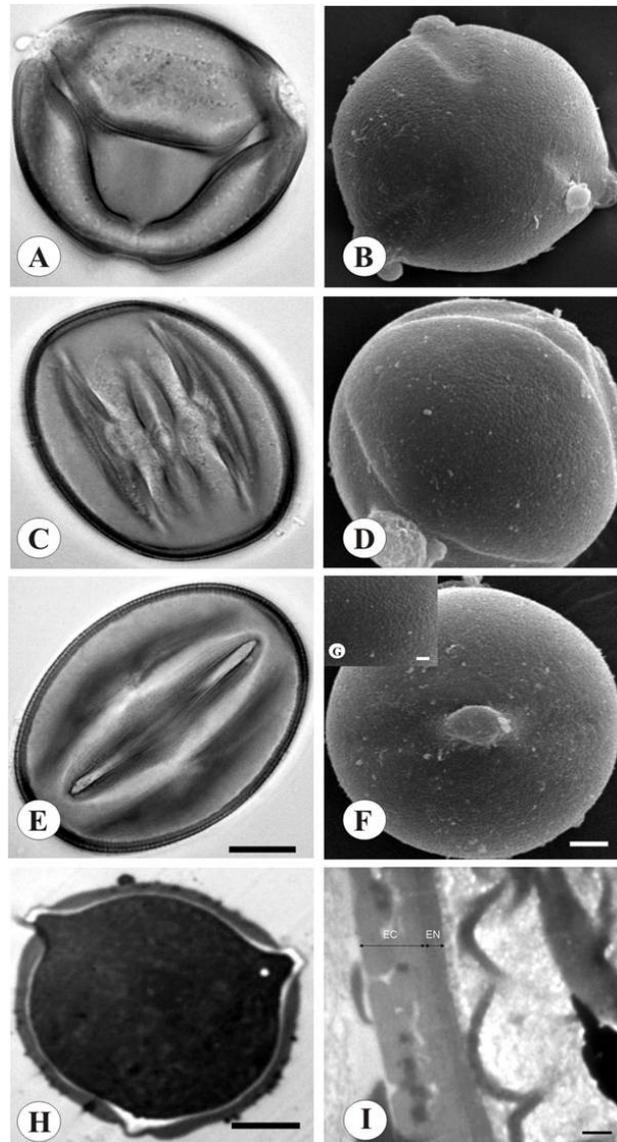


FIGURA 2 Descrição polínica de *Senna cernua*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

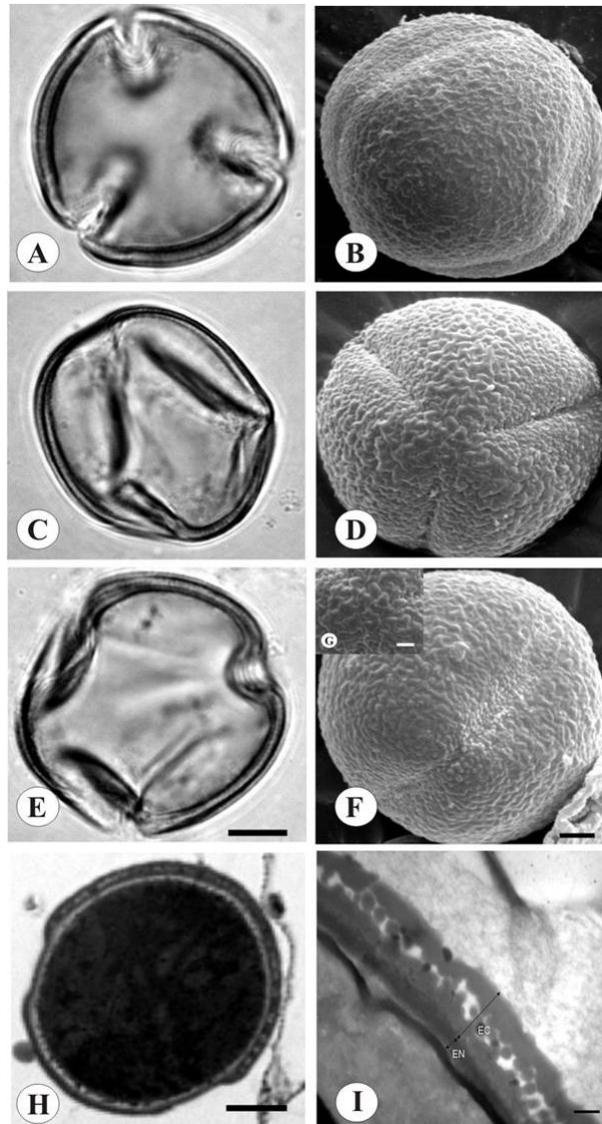


FIGURA 3 Descrição polínica de *Senna corymbosa*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

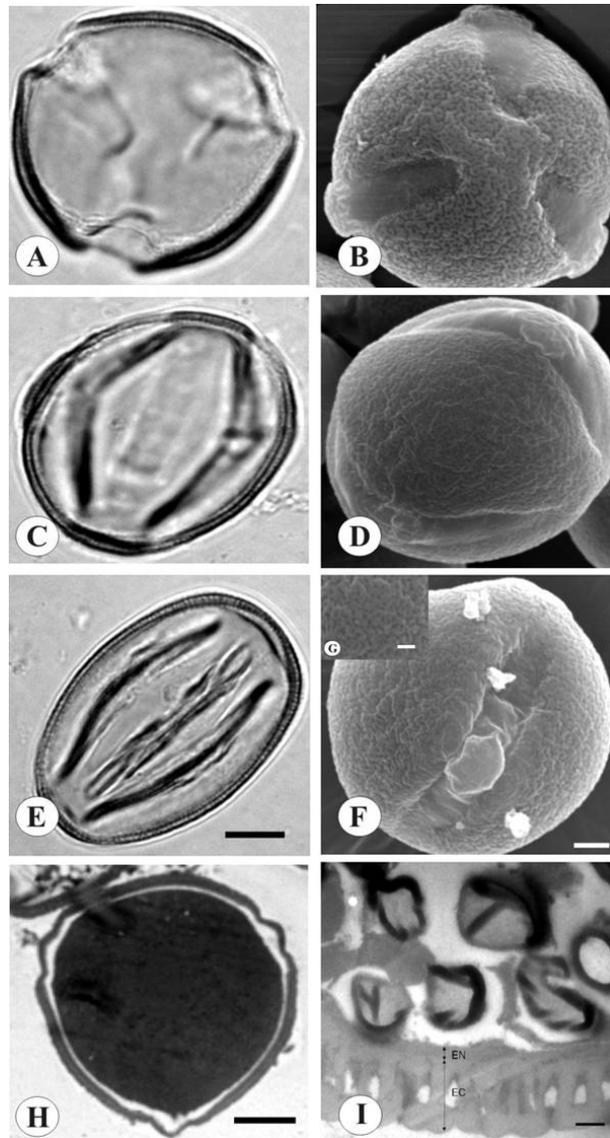


FIGURA 4 Descrição polínica de *Senna multijuga*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

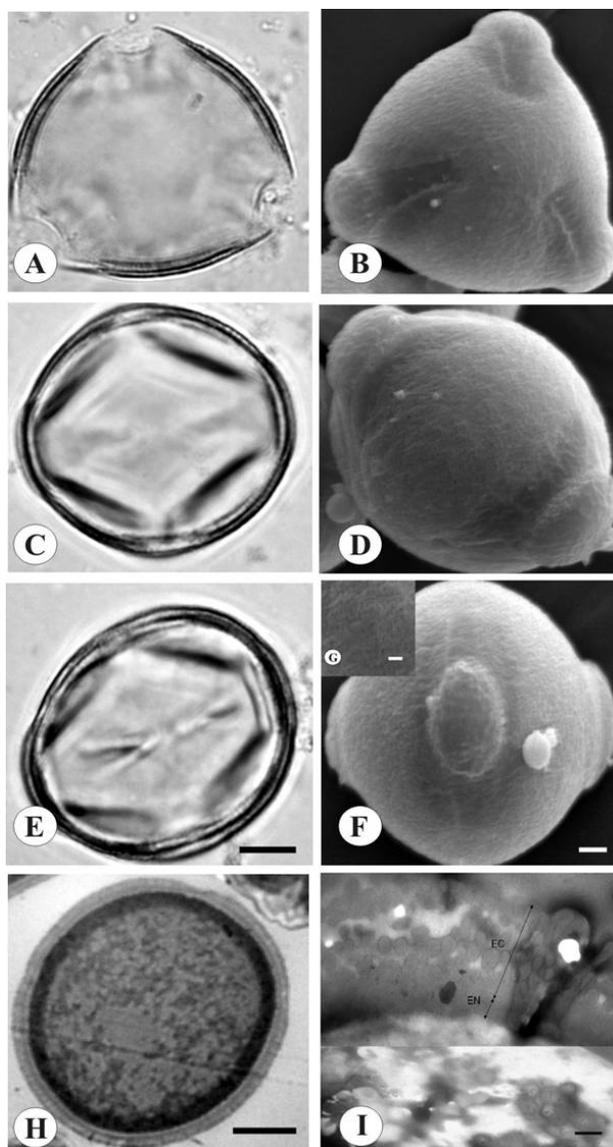


FIGURA 5 Descrição polínica de *Senna alata*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

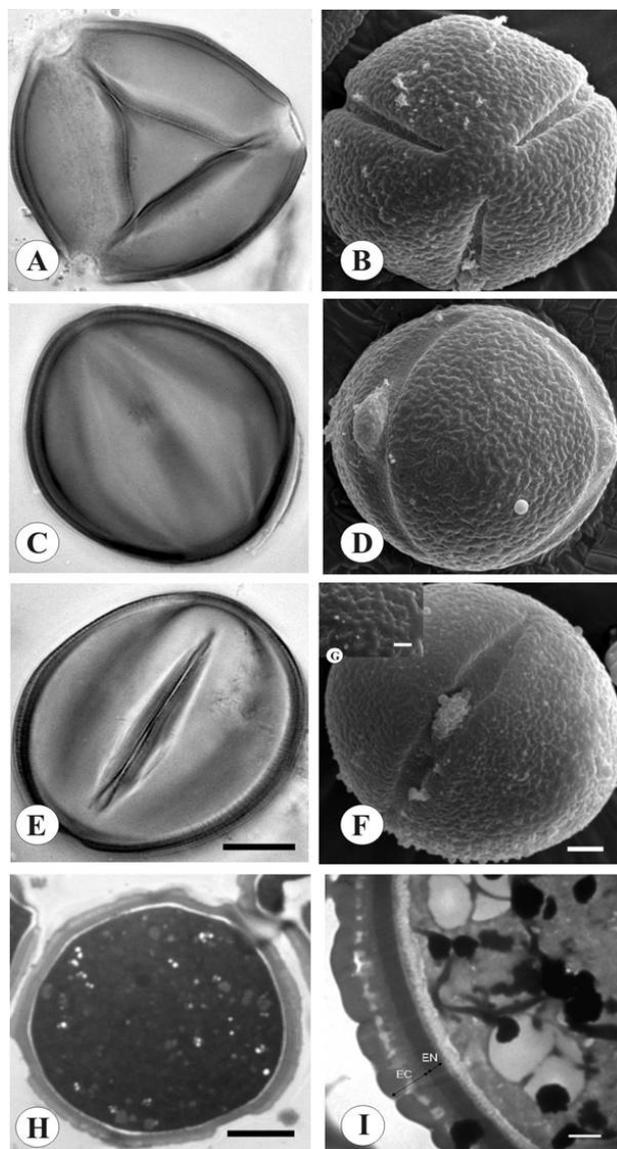


FIGURA 6 Descrição polínica de *Senna siamea*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

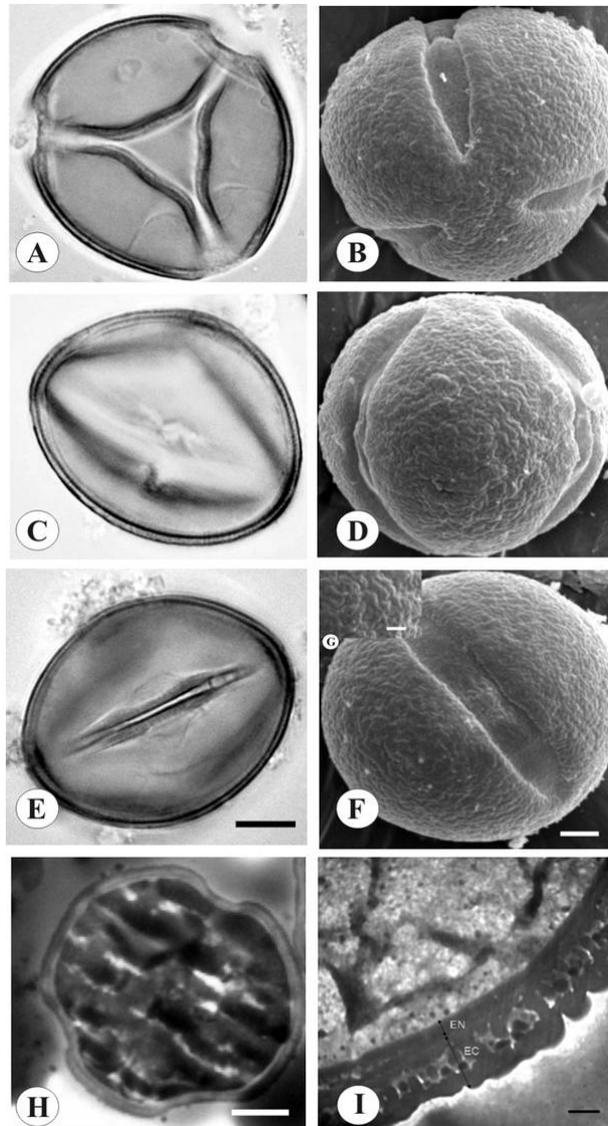


FIGURA 7 Descrição polínica de *Senna spectabilis*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

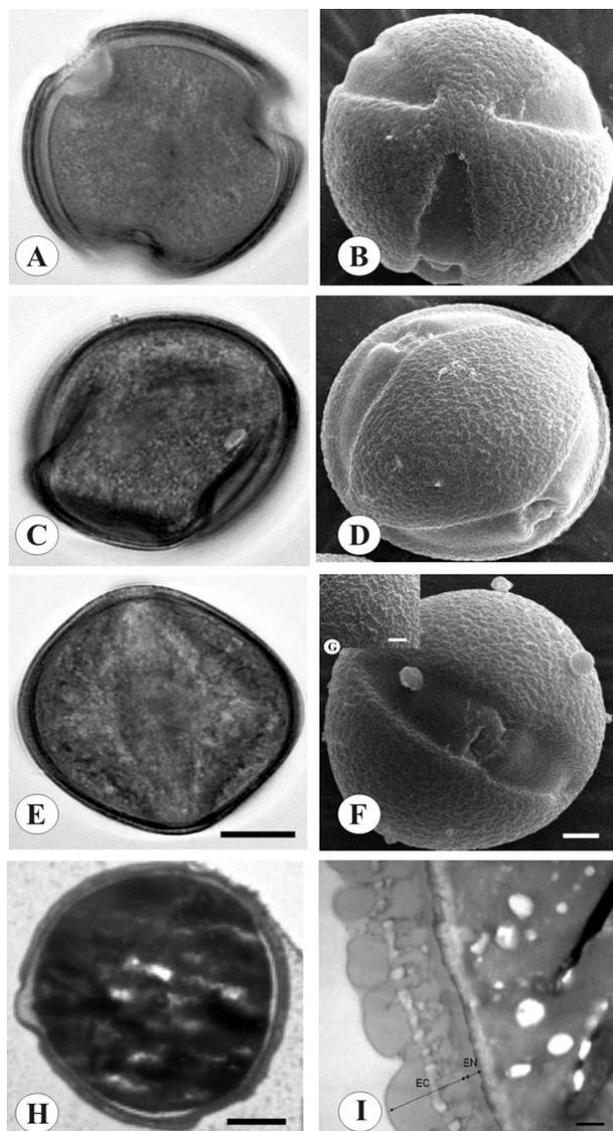


FIGURA 8 Descrição polínica de *Senna macranthera macranthera*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

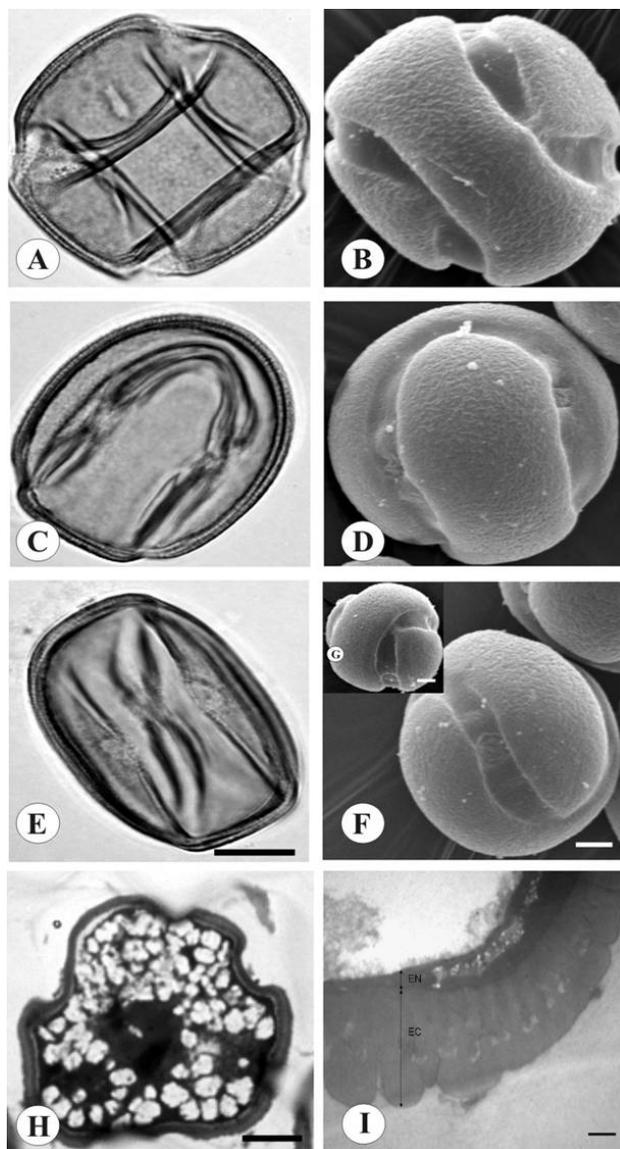


FIGURA 9 Descrição polínica de *Senna rugosa*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

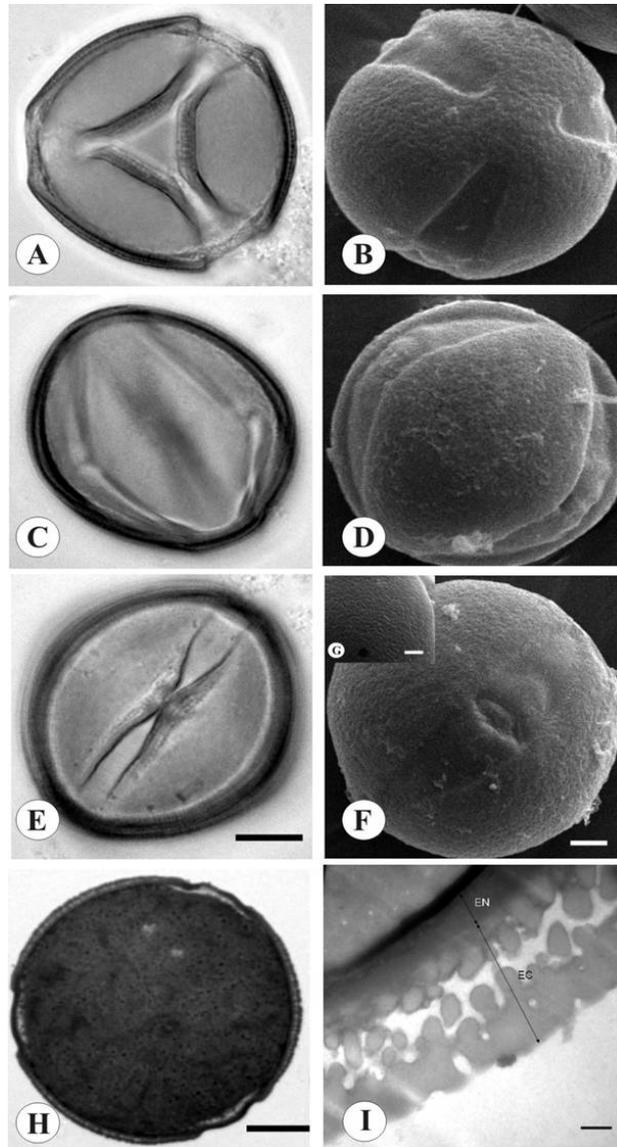


FIGURA 10 Descrição polínica de *Senna splendida splendida*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

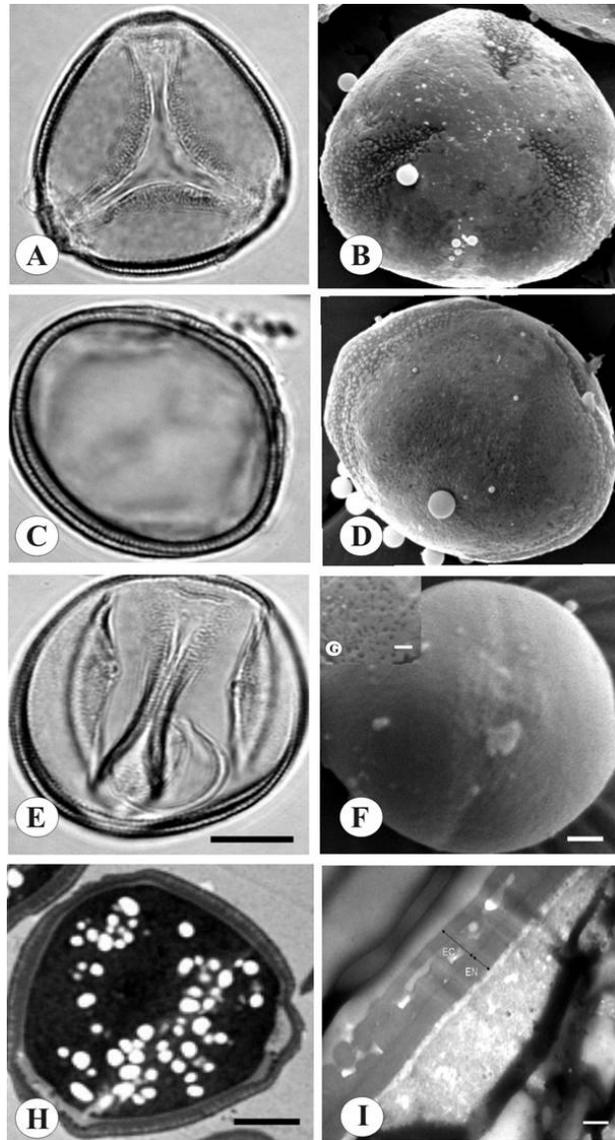


FIGURA 11 Descrição polínica de *Cássia fistula*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

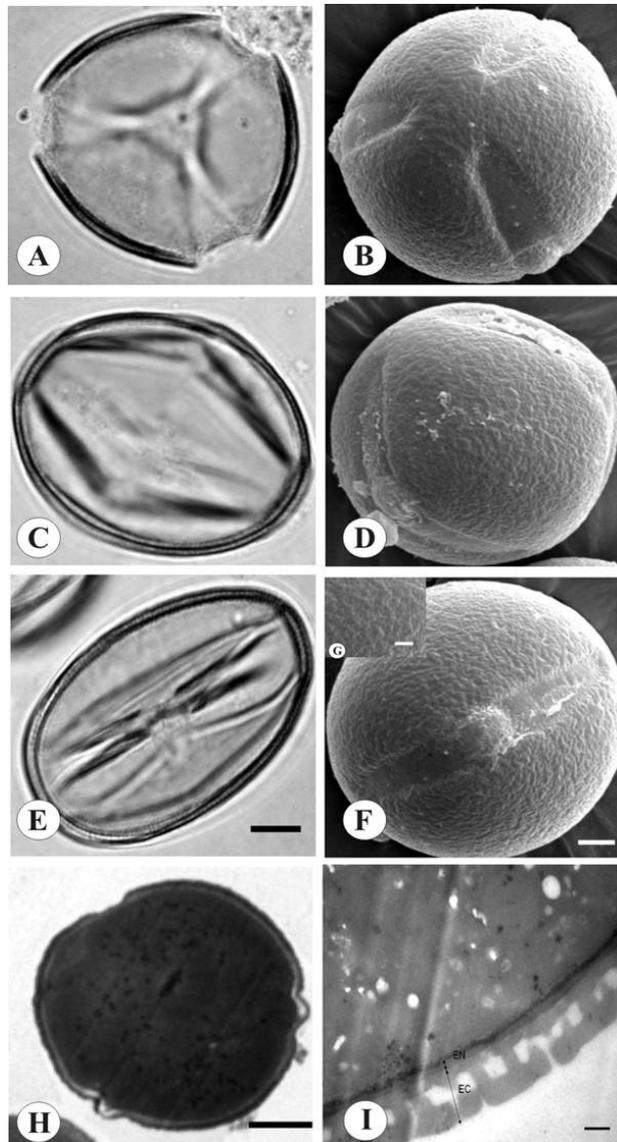


FIGURA 12 Descrição polínica de *Senna pendula*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

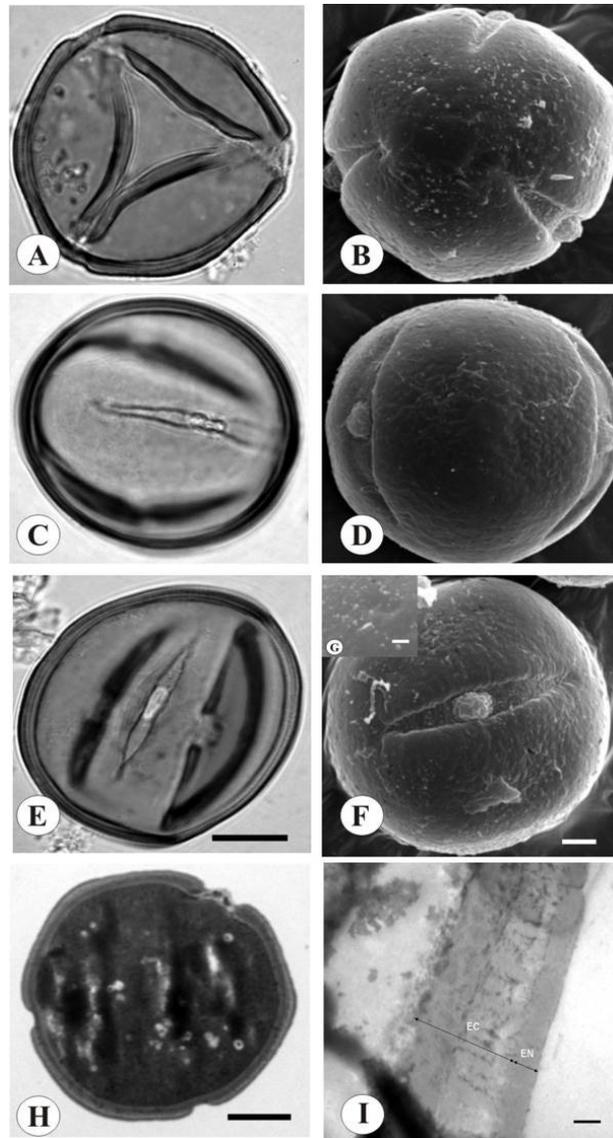


FIGURA 13 Descrição polínica de *Senna silvestres bifaria*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

Em *S. alata*, *S. silvestres* var. *bifaria* e *S. splendida* var. *splendida* a exina é do tipo rugulada, porém, nesta última espécie, esta se encontra com perfurações (Figuras 5G, 13G e 10G), enquanto em *S. corymbosa* e *S. spectabilis* ela é granulada. Neste caso, em MEV pode-se comprovar que a exina possui regiões arredondadas, curtas, assemelhando-se a grânulos (Figuras 3G e 7G). Em *S. cernua* e *S. pendula*, a exina é microrreticulada (Figuras 2G e 12G).

Entre as espécies da tribo Crotalarieae, *C. micans* difere das outras duas com relação ao tipo polínico, ao tamanho do grão de pólen e ao tamanho do colpo e ao tamanho da abertura (Tabelas 4 e 5). Já a espécie *C. zanzibarica* tem a ectoexina mais espessa que a endoexina, enquanto *C. micans* e *C. spectabilis* não diferem com relação à espessura destas duas camadas, assim como espécie *Cassia fistula*, da subfamília Caesalpinioideae (Tabela 3). As três *Crotalaria* analisadas têm exina reticulada com muros finos, rasos, como se apresentassem pequenas depressões.

A análise dos grãos de pólen em MET confirma as proporções das camadas da exina mensuradas sob microscópio fotônico. Revela também variação quanto à presença de grânulos e ao tipo de conteúdo dos mesmos. Foi possível constatar a presença de grânulos de amido no citoplasma de duas espécies do gênero *Crotalaria* (*C. spectabilis* e *C. zanzibarica*) e em apenas uma espécie do gênero *Senna* (*S. multijuga*) (Figuras 14, 15 e 16). Já a espécie *S. alata* foi a única a apresentar grânulos de lipídeos em seu citoplasma (Figura 5I).

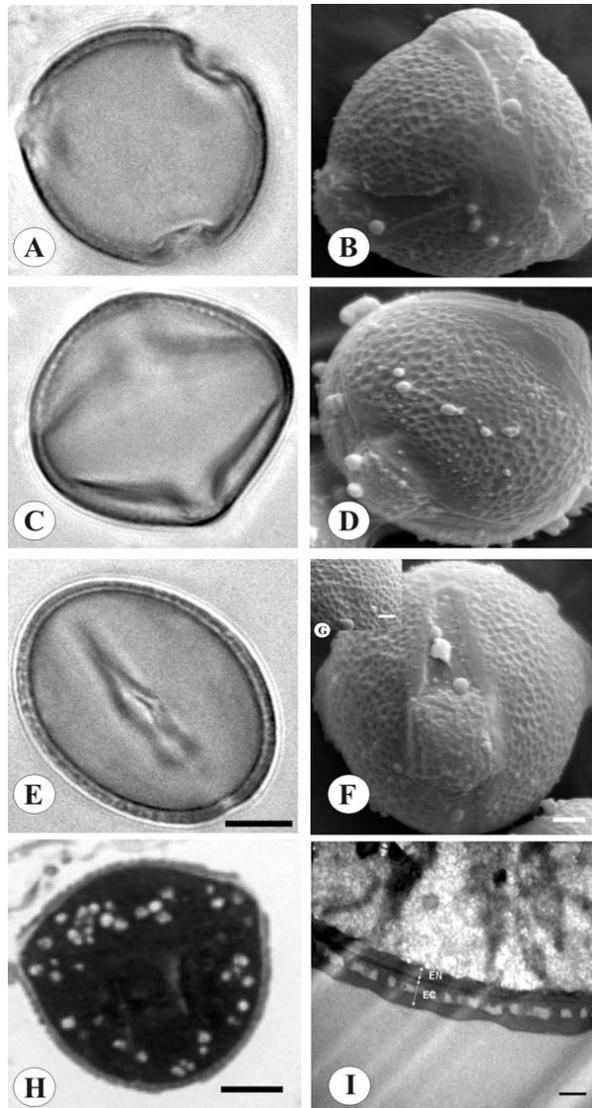


FIGURA 14 Descrição polínica de *Crotalaria zanzibarica*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

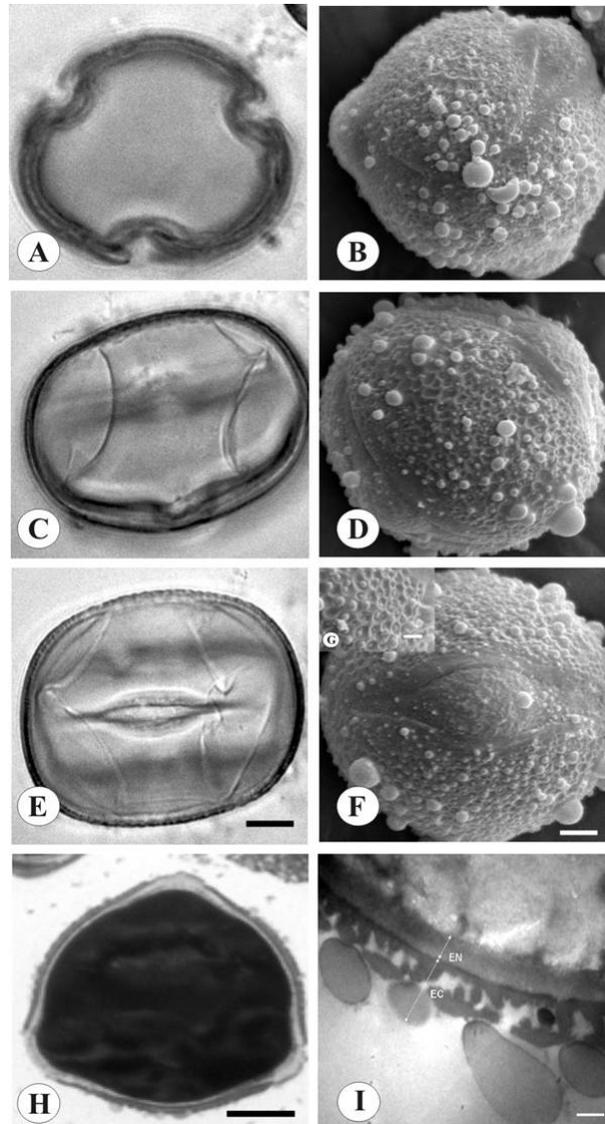


FIGURA 15 Descrição polínica de *Crotalaria micans*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

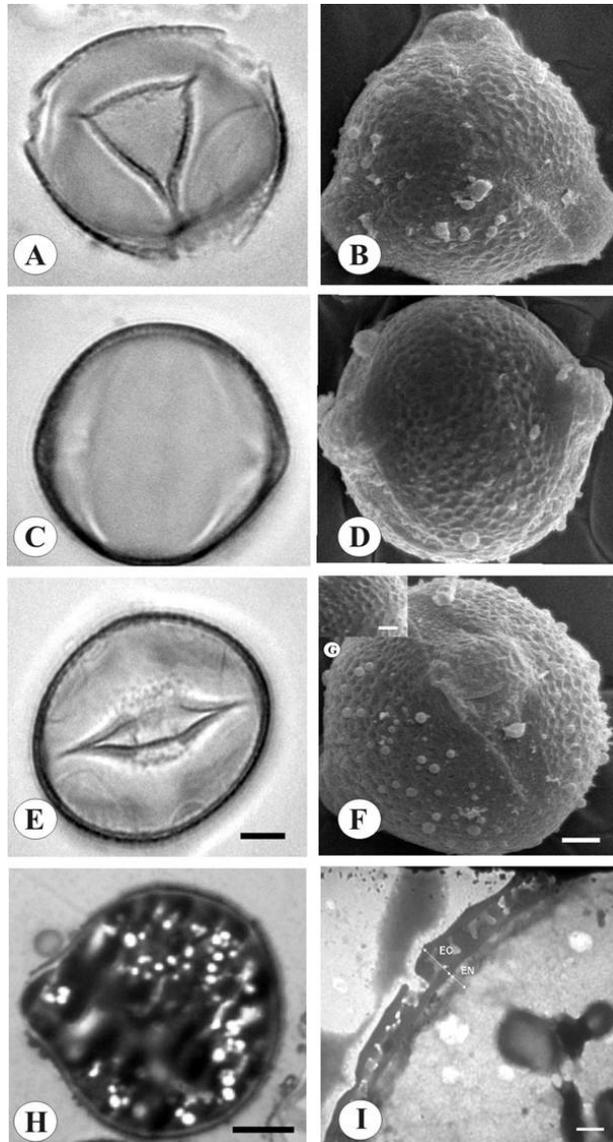


FIGURA 16 Descrição polínica de *Crotalaria spectabilis*. (A) Pólen acetolisado e (B) em MEV, em vista polar, com área polar pequena. (C-E). Pólen acetolisado (barra: 30 μm) e (D-F) em MEV, em vista equatorial (barra: 5 μm). (G) Exina reticulada com muros lisos (barra: 2 μm). (H) Corte semifino (barra: 2 μm). (I) Corte ultrafino em MET (barra: 0,5 μm).

A análise filogenética dos dados resultou em 87 árvores mais parcimoniosas com 62 passos. A árvore consenso stricto para representar a filogenia do grupo de espécies estudadas, com base em caracteres palinológicos é mostrada na Figura 17. Esta árvore apresenta índice de consistência (IC) de 53% e índice de homoplasias (IH), complementar ao de consistência, de 47%. O índice de homoplasias é considerável e isto se deve ao fato de que caracteres palinológicos podem ser altamente homoplásticos, podendo, até mesmo, levar a conceitos incorretos de enraizamento de família e direcionamento de caracteres evolucionários (Doyle & Thomas, 1997). No entanto, alto índice de homoplasias sugere apenas uma abordagem mais profunda dos caracteres ou um fenômeno natural (convergências, reversões e paralelismos), muito comum nas plantas.

Analisando-se os caracteres individuais é possível constatar que os caracteres tamanho polínico, número de aberturas, ornamentação da exina, presença/ausência de grânulos de lipídio, tamanho da área polar e número de colpos apresentam IC = 100%, sendo caracteres consistentes e indicados para análises com dados palinológicos para esse grupo.

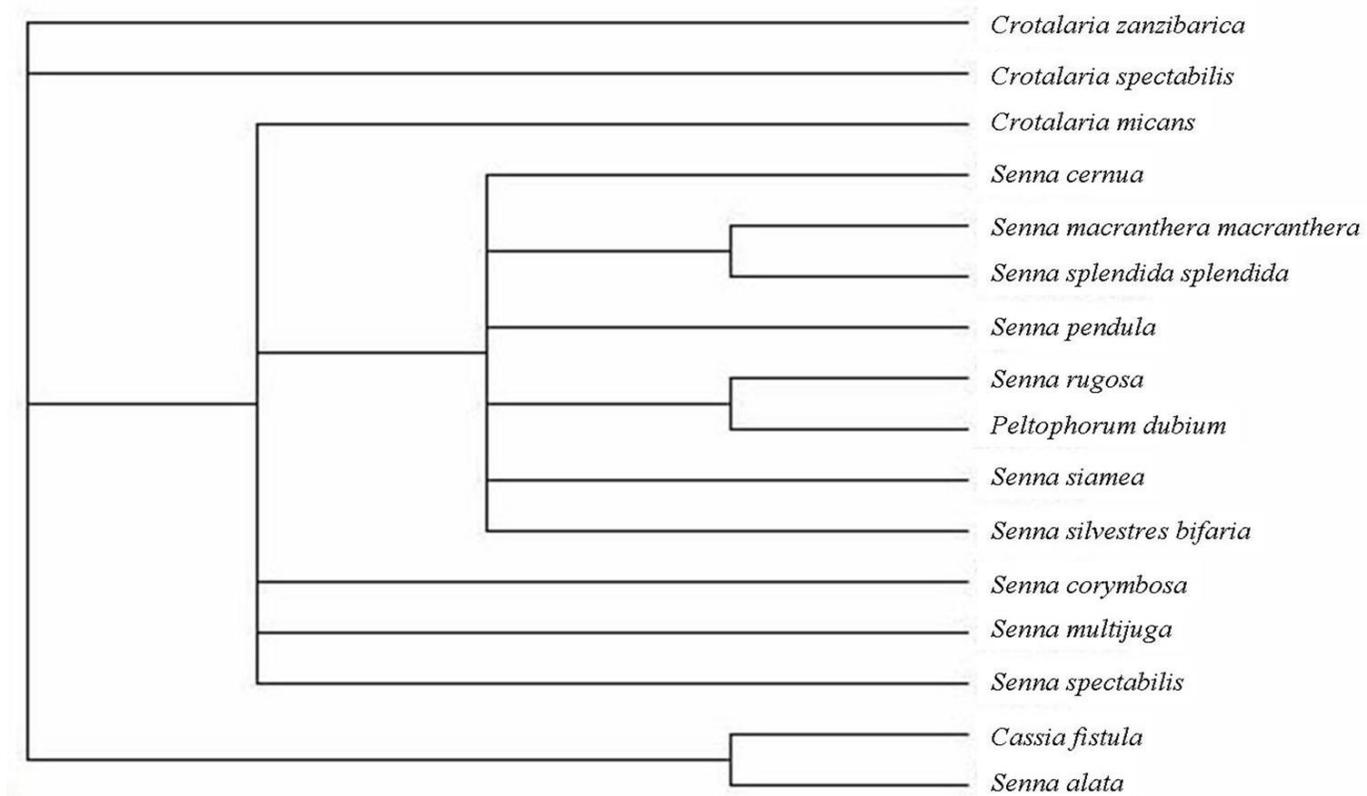


FIGURA 17 Árvore filogenética consenso stricto de espécies das subfamílias Faboideae e Caesalpinioideae, com base em caracteres palinológicos, utilizando o programa PAUP.

Outros trabalhos também discutem a relevância de dados palinológicos para inferências filogenéticas. De acordo com Sauquet & Cantrill (2007), em espécies de Proteaceae, os caracteres palinológicos e filogenéticos mais interessantes foram o tamanho do grão de pólen e os caracteres ultraestruturais da exina, sendo considerados homoplásticos a polaridade e o tipo polínico. Estes autores também relatam que caracteres binários são considerados mais interessantes que caracteres quantitativos para dados palinológicos, do mesmo modo como são feitas as análises clássicas com caracteres morfológicos. No gênero *Paronychia* (Caryophyllaceae), os caracteres tamanho de grão de pólen, nível e diâmetro da abertura e ultraestrutura da exina foram de significância taxonômica (Kaplan, 2008).

Os caracteres número de aberturas e número de colpos são considerados autapomórficos para *S.rugosa*, já que são caracteres derivados exclusivos deste clado. O caráter presença/ausência de lipídeos na composição do citoplasma também é autapomórfico para a espécie *S.alata*.

Neste estudo também é possível observar alguns caracteres não comparáveis ou não aplicáveis, ou seja, onde o estado deste caráter não pode ser definido porque o terminal não apresenta o caráter. Isto é representado pelos caracteres comprimento e tipos de extremidades do colpo e tamanho da área polar na espécie *S.rugosa*.

Observando-se a árvore filogenética com dados palinológicos (Figura 17) pode-se perceber que a espécie *C. micans* comporta-se como um grupo irmão das *Senna* e as espécies *S. macranthera macranthera/S. splendida splendida* compõem um mesmo clado. O mesmo é observado nas espécies *S.rugosa/Peltophorum dubium* e *Cassia fistula/S.alata*.

O fato de espécies de gêneros diferentes estarem agrupadas num mesmo clado, como grupos irmãos, demonstra a falta de consistência no agrupamento do gênero *Senna*, sugerindo estudos biossistemáticos com caracteres adicionais

numa maior distribuição geográfica e num maior número de espécies, visando melhorar a resolução desse grupo.

4 CONCLUSÃO

Nas espécies das subfamílias Caesalpinioidea e Faboideae existe variabilidade polínica útil para inferências filogenéticas.

Os caracteres multiestados apresentam melhor resolução da árvore filogenética quando transformados em binários.

A falta de consistência no agrupamento do gênero *Senna*, com relação a dados palinológicos, sugere estudos biosistemáticos adicionais para melhorar a resolução desse grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIONDO, E.; MIOTTO, S.T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; CASTRO, B. Cytogenetics and cytotaxonomy of brazilian species of *Senna* Mill. (Cassieae – Caesalpinioideae – Leguminosae). **Caryologia**, Florence, n.58, n.2, p.152-163, Apr./June 2005.
- BISBY, F.A. The evaluation and selection of characters in Angiosperm taxonomy: an example from *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.69, n.4, p.1149-1160, 1970.
- BISBY, F.A. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. I. Empirical comparisons of methods using *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.72, n.3, p.699-726, 1973.
- BISBY, F.A.; POLHILL, R.M. The role of taximetrics in angiosperm taxonomy. II. Parallel taximetric and orthodox studies in *Crotalaria* L. **New Phytologist**, New York, v.72, n.3, p.727-742, 1973.
- 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.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLIGAARD, B.B.; LEWIS, G.P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**, New York, v.23, n.3, p.487-514, July/Sept. 2001.
- CHAPILL, J.A. Cladistic analysis of the Leguminosae: the development of an explicit phylogenetic hypothesis. In: CRISP, M.D.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. Part 7, p.1-9.
- DOYLE, J.J. DNA data and legume phylogeny: a progress report. In: CRISP, M.D.; DOYLE, J.J. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. Part 7, p.11-30.
- DOYLE, J.J.; CHAPILL, J.A.; BAILEY, C.D.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2000. Part 9, 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.

DOYLE, A.J.; THOMAS, A.L. Significance of palynology for phylogeny of *Annonaceae*: experiments with removal of pollen characters. **Plant Systematic Evolution**, Vienna, v.206, n.1/4, p.133-159, 1997.

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.

ERDTMAN, V. **Pollen morphology and plant taxonomy**: angiosperms. Stockholm: Almqvist & Wilsell, 1952. 539p.

FAEGRI, K.; INVERSEN, J. **Textbook of modern pollen analysis**. 2.ed. Copenhagen: Scandinavian University Books, 1966.

FLORES, A.S. **Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) no Brasil**. 2004. 213p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, 2004.

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. Part 2, p. 427-463.

GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; MENDONÇA, C.B. Estudo polínico em plantas de restinga do Estado do Rio de Janeiro: Clusiaceae Lindl. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, n.4, p. 527-536, out./dez. 2001.

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.

IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. *Cassieae*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.(Ed.). **Advances in legumes systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. Part 1, p.97-106.

IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. The 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.

KAJITA, T.; OHASHI, H.; TATEISHI, Y.; BAILEY, C.D.; DOYLE, J.J. *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.

KAPLAN, A. Pollen morphology of some Paronychia species (Caryophyllaceae) from Turkey. **Biologia**, Warsaw, v.63, n.1, p.53-60, Feb. 2008.

LEWIS, G.P.; SCHIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

MIRANDA, M.M.B.; ANDRADE, T.A.P. Contribuição ao conhecimento do gênero *Cassia* L. através da morfologia do pólen. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34., Porto Alegre, 1983. **Anais...** Porto Alegre: Sociedade de Botânica do Brasil, 1983. v.2, p. 483-500.

OWENS, S.J.; LEWIS, G.P. Taxonomic and funcional 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.

POLHILL, R.M. Papilionoideae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 1981. Part 1, p.191-208.

POLHILL, R.M. **Crotalaria in Africa and Madagascar**. Rotterdam: A.A. Balkeama, 1982. 389p.

PUNT, W.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. **Glossary of pollen and spore terminology**. 1999. Disponível em: <<http://www.biol.ruu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2009.

SALGADO-LABOURIAU, M.L. **Contribuição à palinologia dos cerrados**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1973.

SAUQUET, H.; CANTRILL, D.J. Pollen diversity and evolution in proteoideae (Proteales: Proteaceae). **Systematic Botany**, New York, v.32, n.2, p.271-316, Apr./June 2007.

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.

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

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. Part 10, p.5-35.

ANEXOS

	Página
ANEXO A Lista de caracteres e estados do caráter.....	110
ANEXO B Matriz ds dados palinológicos.....	112

ANEXO A Lista de caracteres e estados do caráter utilizados para descrever e comparar a morfologia polínica de espécies da subfamília Caesalpinioideae e Faboideae. Os caracteres multiestados são não ordenados, exceto quando indicados.

- 1. Tipo polínico:** (0) subprolato (1,14-1,33 μm); (1) prolato (1,33-2 μm); (2) oblato esferoidal (0,88-1 μm); (3) prolato esferoidal (1-1,14 μm).
- 2. Espessura da exina:** (0) ectoexina menos espessa que a endoexina; (1) ectoexina=endoexina; (2) ectoexina mais espessa que a endoexina.
- 3. Comprimento do colpo:** (0) curto (30-48 μm); (1) longo (48-66 μm).
- 4. Largura do colpo:** (0) estreito (2-4 μm); (1) largo (4-6 μm).
- 5. Profundidade do colpo:** (0) raso; (1) profundo.
- 6. Extremidades do colpo:** (0) agudas; (1) obtusas.
- 7. Comprimento da abertura:** (0) curta (10-16,5 μm); (1) longa (16,5-23 μm).
- 8. Largura da abertura:** (0) estreita (1,5-5 μm); (1) larga (5,5-9,5 μm).
- 9. Área apertural:** (0) proeminente; (1) não proeminente.
- 10. Tamanho polínico:** (0) médio (40-60 μm); (1) grande (60-80 μm); (2) muito grande (80-100 μm) (ordenado).
- 11. Número de aberturas:** (0) três; (1) Quatro.
- 12. Âmbito polínico:** (0) subcircular; (1) triangular; (2) subtriangular; (3) circular; (4) quadrangular.
- 13. Ornamentação da exina:** (0) reticulada com depressões; (1) lisa e verrugosa; (2) rugulada; (3) microrreticulada; (4) granulada; (5) reticulada rugulada; (6) rugulada com perfurações; (7) reticulada com muros lisos.

...continua...

Anexo A Cont.

14. Composição do citoplasma – grãos de amido: (0) presença; (1) ausência.

15. Composição do citoplasma – gotículas de lipídeo: (0) ausência; (1) presença.

16. Tamanho da área polar: (0) pequena (0,20-0,40 μm); (1) grande (0,41-0,60 μm) (ordenado).

17. Número de colpos: (0) três; (1) um.

ANEXO B Matriz dos dados palinológicos.

Taxa	Caracteres										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Crotalaria zanzibarica	000	00	000	0000	00	00	00000000	00	00		
Crotalaria spectabilis	000	10	000	0000	00	00	00000000	00	00		
Crotalaria micans	100	00	000	0100	10	00	00000000	10	00		
Cassia fistula	010	10	000	0001	00	01	10000000	10	00		
S alata	001	00	000	1000	00	01	01000000	11	00		
S cernua	100	00	100	0100	01	02	00100000	10	10		
S corymbosa	100	00	100	0001	10	00	00010000	10	00		
S macranthera macranthera	001	00	101	0011	10	01	00001000	10	00		
S multijuga	100	00	001	1000	10	00	00001000	00	00		
S pendula	100	01	101	1100	10	03	00100000	10	00		
S rugosa	000	01	-11	-101	01	14	00001000	10	-1		
S siamea	000	00	101	0100	01	00	00001000	10	00		
S silvestres bifaria	000	01	101	0100	01	03	01000000	10	10		
S spectabilis	100	00	001	0100	10	00	00010000	10	00		
S splendida splendida	000	00	111	0101	10	03	00000100	10	00		
P dubium	010	01	110	0110	01	03	00000001	10	00		