

**HORACE JOSÉ JIMENEZ**

**Análise Molecular *in silico* e Palinológica de espécies de Amaryllidaceae J. ST. - HIL**

**Recife**

**2019**

**Análise Molecular *in silico* e Palinológica de espécies de Amaryllidaceae J. ST. - HIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:**

Professor Dr. Reginaldo de Carvalho – Orientador – UFRPE

Dr. Rômulo Maciel Moraes Filho – Coorientador – UFRPE

Professora Dra. Luiza Suely Semen Martins – Coorientadora – UFRPE

Professora Dra. Angélica Virginia Valois Montarroyos – Coorientadora – UFRPE

**Recife  
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

J83a José Jimenez, Horace.  
Análise molecular *in silico* e palinológica de espécies de  
Amaryllidaceae J. ST. – Hil / Horace José Jimenez. – Recife,  
2019.  
111 f.: il.

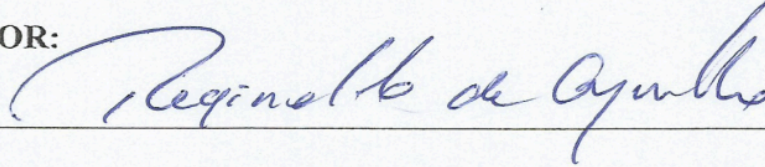
Orientador(a): Reginaldo de Carvalho.  
Coorientador(a): Rômulo Maciel Moraes Filho, Luiza Suely  
Semen Martins.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Agronomia -  
Melhoramento Genético de Plantas, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Amaryllidaceae 2. Bioinformática 3. Palinologia 4. Filogenia  
I. Carvalho, Reginaldo de, orient. II. Moraes Filho, Rômulo Maciel,  
coorient. III. Martins, Luiza Suely Semen, coorient. IV. Título

CDD 574

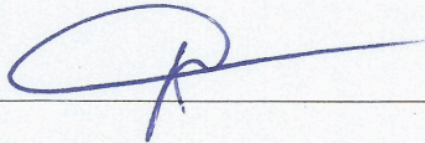
**HORACE JOSE JIMENEZ**

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 27/02/2019

**ORIENTADOR:**

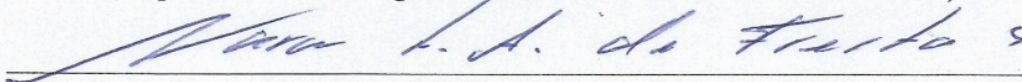
Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

(Departamento de Biologia, Área de Genética - UFRPE)

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho

(Departamento de Agronomia, Área de Fitotecnia – UFRPE)



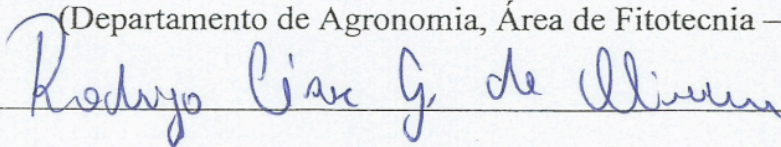
Profa. Dra. Nara Suzy Aguiar de Freitas

(Departamento de Biologia, Área de Genética – UFRPE)



Dra. Simone Santos Lira Silva

(Departamento de Agronomia, Área de Fitotecnia – UFRPE)



Prof. Dr. Rodrigo Cesar G. Oliveira

(Departamento de Biologia, Área de Genética – Uninassau)

RECIFE-PE

2019

## **DEDICATÓRIA**

“A minha esposa Pamela Mirela do Nascimento pelo total apoio, obstinação e carinho, ao meu pai George Chavez Jimenez e a minha mãe Solange Maria Jimenez, pelo esforço para que eu me tornasse a pessoa que eu sou hoje”.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido a vida, me dado paciência e discernimento para enfrentar os percalços existentes nessa longa estrada.
- A minha querida Pamela Mirela pela compreensão e amor.
- Aos meus pais e familiares, pelo companheirismo, compreensão, apoio e força durante toda essa caminhada em minha formação.
- Ao Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, pelos conselhos e orientações.
- Ao Dr. Rômulo Maciel de Moraes sem a qual a tese não poderia ter sido concluída.
- A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luiza Suely Sêmen Martins e a Prof<sup>ª</sup>. Dra Angélica Virginia Valois Montarroyos por todo apoio nas análises moleculares.
- Aos meus companheiros de doutorado Genialdo, Silmar, Antonio de Pádua, Vanessa, Alan e Angélica pelo companheirismo e amizade durante esta jornada.
- Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas, à sua coordenação e a todo seu corpo Docente e Técnico pela acolhida, ensinamentos e compreensão ao longo do meu período de discente.
- A CAPES, pelo auxílio-financeiro e a UFRPE por todo apoio e pela estrutura acadêmica, física e laboratorial oferecida.

## RESUMO

Amaryllidaceae é uma família de monocotiledôneas que compreende 1600 espécies, sendo de ampla ocorrência no mundo. No Brasil são registradas 134 espécies, distribuídas em todas as regiões, onde o gênero *Allium* é o mais importante do ponto de vista agrônomico. Dentro desta família a ação inseticida de muitas lectinas tem sido demonstrada em ensaios com plantas transgênicas. A bioinformática é uma grande aliada dos programas de melhoramento genético utilizando a abordagem *in silico* com o objetivo de identificar, caracterizar e prever domínios proteicos. Além disso esta abordagem tem utilizado genomas plastidiais para inferências filogenéticas e verificar a ocorrência de microssatélites para análise da distância genética entre indivíduos e identificação de cultivares. Assim como análise polínica é empregada em programas de melhoramento genético para verificar a possibilidade de hibridação. O objetivo dessa pesquisa é a utilização de ferramentas de bioinformática para análise *in silico* molecular e palinológica em espécies da família Amaryllidaceae. 22 sequências da lectina de ligação específica à Manose foram tiradas do GenBank. Parâmetros físico-químicos, identificação dos domínios e estimativa dos efeitos funcionais foram realizados pelo ProtParam, ProDom e SNAP2. As árvores filogenéticas foram construídas pelo programa MEGA 7. Previsão, avaliação e validação da estrutura terciária dos modelos foram realizadas pelo servidor Phyre2, Molprobit, ProSA-web e Yasara force Field. Genoma plastidial de quinze espécies foi utilizado para localização das regiões de microssatélites por meio do Gramene e o servidor Dogma. A análise filogenética do genoma plastidial e marcador *matK* foram realizados pelo software MEGA e pelo BEAST. Para a análise palinológica, 25 grãos de pólen de treze espécies foram analisados por meio da microscopia óptica e as descrições palinológicas para a maioria das espécies seguiram esta ordem: tamanho, forma, ângulo e aberturas. Os resultados obtidos entre as sequências da lectina manose específica revelaram a presença de dois motivos funcionais sensíveis à mutação, caráter hidrofílico e uma grande amplitude de ponto isoelétrico com espécies atuando desde meios ácidos a alcalinos. Análise genômica mostrou a presença de microssatélites nos genes *rpoC2*, *cemA*, *ycf2* e *ycf2.1*. No entanto, a maioria dos microssatélites foi localizado nas regiões intergênicas. Foi observado que os microssatélites quanto ao tipo são perfeitos e imperfeitos, onde o do tipo imperfeito foi devido a mutações de transição e transversão. Na análise palinológica, os resultados obtidos indicaram que a forma dos grãos de pólen é do tipo oblato e peroblato, monosulcados, comprimento equatorial maior dos grãos de pólen variando de 22,5 a 145 µm e comprimento equatorial menor dos grãos de pólen

de 16,25 a 93,75  $\mu\text{m}$  entre os gêneros. Em Amaryllidaceae, a morfometria e a forma do pólen não são uma barreira para a ocorrência de híbridos. Os resultados apresentados serão de grande utilidade quanto à importância do uso das ferramentas *in silico* molecular e palinológica. Juntas estas informações podem auxiliar os programas de melhoramento genético da família, seja através de métodos convencionais ou da biotecnologia.

**Palavras-chaves:** Amaryllidaceae, Bioinformática, Palinologia, Filogenia



## ABSTRACT

Amaryllidaceae is a family of monocotyledons that comprises 1600 species, being of wide occurrence in the world. In Brazil, 134 species are registered, distributed in all regions, where the genus *Allium* is the most important from the agronomic point of view. Within this family the insecticidal action of many lectins has been demonstrated in trials with transgenic plants. Bioinformatics is a major ally of genetic breeding programs using the *in-silico* approach to identify, characterize and predict protein domains. In addition, this approach has used plastid genomes for phylogenetic inferences and verified the occurrence of microsatellites to analyze the genetic distance between individuals and identification of cultivars. Just as pollen analysis is used in breeding programs to verify the possibility of hybridization. The objective of this research is the use of bioinformatics tools for molecular and palynological *in silico* analysis in species of the Amaryllidaceae family. Mannose-specific binding lectin sequences were taken from GenBank. Physical-chemical parameters, identification of domains and estimation of functional effects were performed by ProtParam, ProDom and SNAP2. Phylogenetic trees were constructed by the MEGA 7 Program. Prediction, evaluation and validation of the tertiary structure of the models were performed by the server Phyre2, Molprobit, ProSA-web and Yasara force Field. Plastidial genomes of fifteen species were used to localize the microsatellite regions through Gramene and the Dogma server. Phylogenetic analysis of the plastidial genome was performed by the MEGA software and the *matK* marker by the BEAST. For the palynological analysis, 25 pollen grains from thirteen species were analyzed by optical microscopy and the palynological descriptions for most species followed this order: size, shape, shape and apertures. The results obtained between specific mannose lectin sequences revealed the presence of two mutation-sensitive functional motifs, a hydrophilic character and a large isoelectric point amplitude with species acting from acidic to alkaline media. Genomic analysis showed the presence of microsatellites in the *rpoC2*, *cemA*, *ycf2* and *ycf2.1* genes. However, most of the microsatellites were located in the intergenic regions. It was observed that the microsatellites as to the type are perfect and imperfect, where the imperfect type was due to transitional and transverse mutations. In the palynological analysis, the results indicate that the pollen grains are of the oblate and prolate type, monosulcated, with a larger equatorial length of the pollen grains ranging from 22,5 to 145  $\mu\text{m}$  and smaller equatorial length of the pollen grains of 16,25 to 93,75  $\mu\text{m}$  among genus. In Amaryllidaceae, morphometry and pollen shape are not a barrier to the

occurrence of hybrids. The results presented will be very useful as regards the importance of the use of *in silico* molecular and palynological tools. Together, this information can help family genetic improvement programs, either through conventional methods or through biotechnology.

**Keywords:** Amaryllidaceae, Bioinformatics, Palynology, Phylogeny.

**CAPÍTULO II**

<b>Tabela 1.</b> Análise da estrutura primária e localização subcelular das seqüências de lectina manose-específica avaliadas.....	62
--	----

**CAPÍTULO III**

<b>Tabela 1.</b> Espécies da família Amaryllidaceae, com suas respectivas características obtidas através do banco de dados do NCBI .....	88
---	----

<b>Tabela 2.</b> Número absoluto de microssatélites. Os números entre parênteses representam a frequência (%) dos SSRs dos cloroplastos gênicos e intergênicos com base no tamanho do motivo para cada espécie.....	88
---	----

<b>Tabela 3.</b> Lista de genes de plastídios que foram encontradas incomuns entre as quinze espécies de Amaryllidaceae incluídas no estudo comparativo. Os dados fora dos parênteses representam o motivo para cada repetição e a repetição do número de bases nitrogenadas.....	89
---	----

**CAPÍTULO IV**

<b>Tabela 1.</b> Características palinomorfológicas de espécies de Amaryllidaceae.....	109
--	-----

**CAPÍTULO II**

- Figura 1.** Alinhamento de seqüências de lectina manose-específica avaliadas. As seqüências foram alinhadas por ClustalW, onde os resíduos idênticos e similares são exibidos na mesma cor ..... 63
- Figura 2.** Previsão dos efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor SNAP2 e Domínios funcionais da lectina manose-específica observados pelo servidor ProDom..... 63
- Figura 3.** Árvore filogenética das espécies de *Allium*, geradas com base nas seqüências de lectinamanose-específica pelo método máxima parcimônia (MP). Círculos amarelos indicam proteínas ácidas e círculos azuis indicam proteínas alcalinas. As espécies estão representadas por seus respectivos subgêneros. A letra n indica o número cromossômico haplóide das espécies de *Allium*. A figura retangular de coloração vermelha indica o domínio funcional PD330654 e a figura retangular de coloração azul indica o domínio funcional PD585253..... 64
- Figura 4.** Árvore filogenética das espécies da família Amaryllidaceae geradas com base nas seqüências de lectinamanose-específica pelo método máxima parcimônia (MP). As tribos das subfamílias Allioideae e Amaryllioideae estão indicadas à esquerda das barras representativas das subfamílias. As espécies inclusas foram: *Crinum asiaticum* var. *sinicum* (GenBank: AAO59507.1), *Zephyranthes minuta* (GenBank: AAN73327.1), *Zephyranthes candida* (GenBank: AAM27447.1), *Hippeastrum vittatum* (GenBank: AAP57409.1), *Galanthus nivalis* (GenBank: AAA33346.1), *Narcissus tazetta* (GenBank: ACR15122.1), *Narcissus tazetta* var. *chinensis* (GenBank: ADN05761.1), *Clivia miniata* (GenBank: AAA19913.1) e *Lycoris radiata* (GenBank: AAP20877.1). Figuras obtidas em <https://pfaf.org/>. \*A espécie *Zephyranthes minuta* está identificada no GenBank com a sinonímia *Amaryllis minuta*..... 65
- Figura 5.** Estrutura tridimensional predita pelo servidor Phyre2 para lectina manose-específica da espécie *A. sativum* (A1) e *A. ursinum*. (A2). Hidrofobicidade representada como gradiente de cor, sendo o azul o mais hidrofílico e vermelho alaranjado para os mais hidrofóbicos da espécie *A. sativum* e (B2) *A. ursinum* (B1). Superfície eletrostática representada como um gradiente de cor, a partir do mais carregado negativamente (vermelho) para o mais positivamente carregado (azul) da espécie *A. sativum* (A3) e *A. ursinum* (B3)..... 66
- Figura 6.** Gráfico de Ramachandran gerado pelo servidor MolProbity, a partir do modelo tridimensional construído pelo servidor Phyre2 para *A. sativum* (A1). E *A. ursinum* (B1). Valor do Z-score (ponto preto) pelo ProSA-web para *A. sativum* (A2) e *A. ursinum* (B2). Uso do ProSA-web para lectina manose-específica mostrando o gráfico de energia de scores de resíduos da estrutura de proteína nativa para *A. sativum* (A3) e *A. ursinum* (B3)..... 67

**CAPÍTULO III**

- Figura 1.** Alinhamento múltiplo de seqüências dos genes contendo microssatélites, em estudos da família Amaryllidaceae ..... 89
- Figura 2.** Alinhamento de seqüências completas de plastomas de 14 espécies da família Amaryllidaceae. Regiões em azul identificam regiões codificantes segundo anotação para *A. cepa*, obtida pelo servidor DOGMA. A representação linear do Plastoma de *A. cepa* foi obtida pelo servidor OGDRAW (Lohse et al. 2013). Regiões em rosa representam regiões não-codificantes conservadas. A espécie *Y. filamentosa* foi utilizada como grupo externo. SV = Sítios variáveis..... 90
- Figura 3.** Filogenia do gênero *Allium* baseada em genomas plastidiais completos. Plastomas de *A. Obliquum* (NC\_037199.1), *A. sativum* (NC\_031829.1), *A. pratti*

(NC\_037432.1), *A. victorialis* (NC\_037240.1), *A. cepa* (KM088013.1), *A. macleanii* (LT699703.1), *A. Fistulosum* (LT674586.1), *A. schoenoprasum* (LT699700.1), *A. nutans* (LT799837.1), *A. cepa* macho fértil (NC\_024813.1), *A. cepa* macho estéril (KF728079.1), *A. ursinum* (MH157875.1), *A. paradoxum* (LT622239.1) e *A. platyspathum* (LT673892.1). Foi incluída como grupo externo a espécie *Yucca filamentosa* (NC\_032712.1). A árvore filogenética foi gerada pelo software MEGA7, usando o método de máxima verossimilhança, e o suporte de bootstrap foi calculado usando 1000 replicatas. Valores de suporte de bootstrap (%) são mostrados na interseção de cada ramo..... 91

**Figura 4.** Filogenia da família Amaryllidaceae baseada em sequências do gene plastidial *matK*. A árvore filogenética foi gerada pelo software BEAST, usando o método Bayesiano. Valores de suporte PP (%) são mostrados na interseção de cada ramo..... 92

#### CAPÍTULO IV

**Figura 1.** Grãos de pólen de Amaryllidaceae. **A.** *Narcissus triandus* L. **B.** *Narcissus bulbocodium* L. **C.** *Amarylis* sp. **D.** *Narcissus cyclamineus* DC. **E.** *Zephyranthes* sp. Herb. **F.** *Habranthus itaobinus* Ravenna. **G.** *Nothoscordum pernambucanum* Ravenna. **H.** *Hippeastrum stylosum* Herb. **I.** *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze e **J.** *Habranthus* sp Herb..... 110

## SUMÁRIO

xiv

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii

### **CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA**

1. Introdução Geral.....	16
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1 Centro de origem, Distribuição geográfica e Características morfológicas.....	17
2.2 Importância econômica da família Amaryllidaceae.....	19
2.3 Melhoramento genético de Amaryllidaceae.....	20
2.4 Filogenia molecular.....	20
2.5 Bioinformática.....	23
2.6 Filotaxonomia.....	25
2.7 Genoma plastidial.....	26
2.8 Lectina de plantas.....	27
2.9 Palinologia.....	28
3. Referências Bibliográficas.....	29

### **CAPÍTULO II: Caracterização *in silico* e análise filogenética de uma lectina manose-específica em espécies do gênero *allium***

1. Resumo.....	43
2. Abstract.....	44
3. Introdução.....	44
4. Material e Métodos.....	47
5. Resultados e Discussões.....	48
6. Conclusões.....	54
7. Agradecimentos.....	55
8. Referências Bibliográficas.....	55

### **CAPÍTULO III: Genômica comparativa de plastomas de espécies da família *Amaryllidaceae***

1. Resumo.....	69
2. Abstract.....	70
3. Introdução.....	70
4. Material e Métodos.....	73
5. Resultados e Discussões.....	75
6. Conclusões.....	82
7. Agradecimentos.....	82
8. Referências Bibliográficas.....	82

### **CAPÍTULO IV: Estudo palinológico em espécies de *Amaryllidaceae***

1. Resumo.....	94
2. Abstract.....	95
3. Introdução.....	96
4. Material e Métodos.....	97
5. Resultados e Discursões.....	98
6. Conclusões.....	104
7. Agradecimentos.....	105
8. Referências Bibliográficas.....	105

**REVISÃO DE LITERATURA**

---

**CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Amaryllidaceae é uma família de monocotiledôneas com ocorrência em regiões temperadas e quentes do mundo (Jin 2011) com a América do Sul, África do Sul e o Mediterrâneo sendo os principais centros de diversidade da família (Jin 2016). No Brasil, está presente em várias regiões, contabilizando 134 espécies, das quais 75 endêmicas. Suas espécies possuem alcalóides como principais componentes farmacológicos. São plantas ornamentais, herbáceas, bulbosas, com sistema de reprodução sexuada e vegetativa e ocorrem em diversos ambientes como cerrados, caatingas, florestas, restingas, etc (Dutilh et al. 2013, Bastida et al. 2011).

Pesquisas moleculares vêm sendo utilizadas junto a caracteres morfológicos, anatômicos, embriológicos e bioquímicos para resolver questões taxonômicas apresentadas pela família (Amaral 2007, Alves-Araújo et al. 2012, Raymúndez et al. 2008, Ronsted et al. 2012). A utilização de marcadores *rps16* de cloroplasto e ITS revelou monofiletismo do gênero *Allium* (Li et al. 2010). Sequências *trnL-F* e ITS evidenciaram correlações positivas entre aspectos geológicos e ecológicos para o gênero *Crinum* L (Garcia et al. 2014, Kwembeya et al. 2007).

A bioinformática é uma grande aliada nas pesquisas de biologia molecular. Por meio das suas ferramentas é possível manejar uma grande variedade de dados biológicos; sendo possível interpretar, armazenar, processar, decifrar estruturas e analisar os programas e algoritmos desenvolvidos com grandes quantidades de informações (Borém e Santos 2001). Vários programas e estratégias *in silico* tem sido utilizados no sentido de identificar, caracterizar e comparar regiões do genoma plastidial e compreender o papel das proteínas dentro de grupos de organismos (Kumar et al. 2004). As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que exibem ao menos um domínio não catalítico (Sharon et al. 2004). A ação inseticida de muitas lectinas de plantas tem sido demonstrada em ensaios *in vitro* e em estudos com plantas transgênicas (Macedo et al. 2004, Macedo et al. 2007), pois podem inferir resistência a insetos, podendo representar um potencial ganho econômico contra pragas na agricultura.



Em relação às características palinológicas, a variabilidade morfológica encontrada nos vários tipos de pólen tem sido empregada como um instrumento útil em várias áreas do conhecimento, como cladística, ecologia e fitogeografia (Melhem et al. 2003). Variações na forma, tamanho do pólen, polaridade, simetria, estrutura de abertura, ornamentação da superfície e outras características podem ser aplicadas em estudos taxonômicos e em programas de melhoramento genético visando uma melhor avaliação de híbridos encontrados na natureza ou produzidos artificialmente (Pilarek et al. 2013).

Nessa perspectiva, a presente tese teve por objetivo: 1) ampliar os conhecimentos genéticos e taxonômicos em Amaryllidaceae, caracterizar, comparar e identificar domínios conservados em sequências de aminoácidos de uma lectina manose específica para o gênero *Allium* disponíveis em bancos de dados públicos; 2) Realizar uma análise filogenética baseada no genoma plastidial, para compreensão das relações entre espécies do gênero *Allium* e também em nível da família Amaryllidaceae; 3) Desenvolver modelos tridimensionais da lectina de representantes do gênero *Allium*, com base na metodologia de modelagem por homologia, de forma a possibilitar uma melhor compreensão de suas estruturas e funções moleculares; 4) observar a ocorrência de marcadores SSRs em genomas plastidiais e 5) caracterizar a morfologia, morfometria e estrutura do pólen de espécies de Amaryllidaceae usando as técnicas de acetólise e microscopia óptica.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Centro de origem, distribuição geográfica e características morfológicas**

Amaryllidaceae é uma família de monocotiledôneas pertencente à ordem Asparagales, ocorrendo em diversos continentes (Jin 2011). América do Sul, África do Sul e o Mediterrâneo são os principais centros de diversidade da família (Bastida et al. 2011, Jin 2016). Nos neotrópicos, a família se estende desde a América Central a América do Sul. Os maiores gêneros são *Hippeastrum* (60 espécies), *Hymenocallis* (50 espécies), *Zephyranthes* (70 espécies) e *Clinanthus* (30 espécies)

(Meerow 2009, Souza e Lorenzi 2012). No Brasil, a família está presente em várias regiões, contabilizando 134 espécies e 75 endêmicas e ocorrem em diversos ecossistemas (Dutilh et al. 2013).

A subfamília Amaryllidoideae compreende 59 gêneros e 850 espécies com centros de diversidade na África do Sul, América do Sul, especificamente na região andina e no Mediterrâneo (Meerow e Shijman 2006). A subfamília Agapanthoideae contém apenas um gênero *Agapanthus* com dez espécies distribuídas apenas na África do Sul (Leighton 1965).

A subfamília Allioideae engloba representantes distribuídos em quatro tribos geograficamente distintos. A tribo Allieae com apenas um gênero *Allium* possui um enorme centro de diversidade que se alonga desde a Bacia do Mediterrâneo até a Ásia central e o Paquistão, e outro distribuído no oeste da América do Norte (Li et al. 2010). A tribo Tulbaghieae com apenas um gênero *Tulbaghia* é distribuída na África do Sul, especialmente no Cabo Oriental (Stafford et al. 2016). As tribos Leucocoryneae e Gilliesieae são endêmicas da América do Sul (Sassone et al. 2018).

A família Amaryllidaceae é identificada por possuir bulbos subterrâneos, ervas terrestres, perenes ou bianuais e terrestres, com presença de alcalóides e látex (Souza e Lorenzi 2012). O caule é herbáceo, baixo e possui crescimento simpodial (dominância das gemas laterais em relação à apical). As folhas são simples, anuais, alternas dísticas ou espiraladas, lanceoladas, lineares com tricomas, já a inflorescência é cimosa, umbeliforme, apoiada por duas brácteas livres apenas por um lado (Oliveira et al. 2010).

As flores são vistosas, epíginas e bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, pediceladas e raramente sésseis, sendo eretas ou declinadas, monóclinas e protândricas, com seis tépalas petalóides, em dois verticilos formando um hipanto (Amaral 2007). Os grãos de pólen são mônades, heteropolar-bilaterais, monosulcados e âmbito elíptico/elipsoidal (Alves-Araujo 2012). O ovário é sincárpico, súpero ou ínfero, trilocular com nectários septais e mais de um óvulo por lóculo e placentação axilar (Amaral 2007, Souza e Lorenzi 2012). Os frutos são deiscentes ou indeiscentes, com formato muito variável. As sementes podem ser secas ou carnudas, largas e sem dormência, sendo geralmente escuras a negras em função de uma camada externa de fitomelanina (Strydom 2005).

## 2.2. Importância econômica da família Amaryllidaceae

A atividade econômica mais importante das Amaryllidaceae é a utilização das plantas para uso ornamental, onde os gêneros *Galanthus* (Falkowska et al. 2018), *Leucojum* (Otvos et al. 2016) e *Narcissus* (Otvos et al. 2016, Husti e Cantor 2015) são as plantas bulbosas mais comercializadas nas regiões de clima temperado. Outras espécies conhecidas se destacam como o lírio-beladona (*Amaryllis belladonna* L.), a clívia (*Clivia miniata* (Lindl.) Bosse), o zefirantes (*Zephyranthes candida* (Lindl.) Herb.), açucena (*Hippeastrum spp.*), a coroa-imperial (*Scadoxus multiflorus* (Martyn) e o agapanto (*Agapanthus africanus* (L.) (Souza e Lorenzi 2012). Representantes do gênero *Hippeastrum*, *Crinum*, *Narcissus*, *Eucharis* e *Galanthus* tem sido utilizados na formação de híbridos para aquisição de novas plantas ornamentais (Souza e Lorenzi 2012).

Os alcalóides são apontados como os principais componentes relacionados aos efeitos farmacológicos encontrados nas plantas (Jin 2009). Possuem no mínimo um átomo de nitrogênio em sua composição que é derivado do metabolismo de aminoácidos (Bessa et al. 2017). Em amaryllidaceae, os alcaloides são classificados em nove grupos: norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina, tazetina, montanina e galantamina. A licorina mostra potencial de inibir células de melanoma, carcinoma, células de leucemia e atividade antiviral (Van Goitsenoven et al. 2012). A tazetina apresenta atividade antitumoral e antimalárica (Bastida et al. 2006). A montanina tem exibido capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase, bem como de ser capaz de ativar enzimas relacionadas com os processos de formação de memória (Pagliosa et al. 2010). A galantamina é o alcaloide mais estudado em Amaryllidaceae e utilizado no combate a doença de Alzheimer (Bastida et al. 2011).

O gênero *Allium*, por exemplo, o *sativum* L. apresenta atividade antiviral (Tsai et al. 1985), antibacteriana (Srinivasan et al. 2001), antifúngica (Thangavelu et al. 2013), antimicrobiana (Goncagul e Ayaz 2010), antiinflamatório (Hodge et al. 2002, Chu et al. 2017) e antioxidante (Shori et al. 2014). Nos últimos anos, análises tem-se focado sobre os efeitos preventivos e curativos do *A. sativum* sobre as doenças cardiovasculares e câncer (Nicastro et al. 2015, Schwingshackl et al. 2016).

Outras espécies além do *A. sativum* L. são conhecidas por serem utilizadas na alimentação, especialmente *Allium cepa* L., *A. fistulosum* L., *A. schoenoprasum* L. e *A. ampeloprasum* L. (Souza e Lorenzi 2012).

### 2.3. Melhoramento Genético de Amaryllidaceae

No Brasil, o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) é um instituto de excelência na pesquisa com Amarílis e na geração de híbridos obtidos por meio de cruzamentos interespecíficos utilizando germoplasma nativo (Tombolato 2004). Os programas de melhoramento genético com *Hippeastrum*, em escala mundial, produziram milhares de híbridos comerciais (Tombolato 2004). O híbrido “*Hippeastrum x hybridum*” foi comercializado por muitos anos em países como a Holanda, México, Chile e Argentina (Amaral 2011). Os principais objetivos do melhoramento genético nessa cultura abrangem a seleção das seguintes características: tolerância ao frio, obtenção de flores perfumadas, maior número de flores por inflorescência, coloração da flor, resistência a patógenos e forma de ramagens foliares (Coertze e Louw 1990).

O gênero *Zephyranthes* apresenta potencial para uso em programas de melhoramento genético devido a presença de poliploidia em diversas espécies, sendo algumas delas provenientes da hibridização interespecíficas (Flory e Smith 1980). O cultivo e comercialização de híbridos naturais de *Narcissus* têm sido comuns em vários países (Souza e Lorenzi 2012). No gênero *Allium*, o programa de melhoramento genético de cebola (*Allium cepa* L.) do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) é um exemplo da relevância de programas locais. As cultivares ofertadas pela pesquisa em melhoramento genético de cebola no Brasil promoveram ganhos importantes em produtividade, diversidade, adaptação a estresses bióticos e abióticos (Oliveira et al. 2004).

### 2.4. Filogenia Molecular

A filogenia molecular pode utilizar marcadores moleculares como sequências de ácidos nucléicos e aminoácidos para estudo das relações evolutivas entre espécies de um determinado grupo

taxonômico (Graur e Li 2000). Logo, os processos evolutivos envolvidos na reconstrução filogenética de organismos e suas rotas metabólicas, assim como sua origem, tem se tornado a principal ferramenta dos pesquisadores nos últimos anos devido ao uso de dados moleculares (Aleixo et al. 2006, Gompert et al. 2006, Maira et al. 2013).

Nas análises filogenéticas, sequências que não sofrem pressão de conservação evolutiva como os íntrons e espaçadores de genes nucleares de DNAr (ITS) têm sua importância por serem regiões que tendem a acumular mutações mais rapidamente. Estas regiões estão sendo utilizadas em estudos taxonômicos em níveis infragenéricos (Karehed e Bremer 2007, Kim et al. 2010). Por outro lado, o genoma de cloroplasto (cpDNA) apresenta estabilidade estrutural, além de mostrar uma sequência altamente conservada em termos de tamanho, estrutura, conteúdo e ordem dos genes, podendo ser fortemente empregado em estudos de filogenia (Judd et al. 2002).

Muitas análises filogenéticas por meio do genoma de cloroplasto abrange o gene *rbcL* codificador da subunidade maior da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase e que apresenta taxa de evolução lenta com boa resolução ao nível de família para angiospermas (Salamin et al. 2005). Entre as regiões plastidiais não codificadoras tem-se o íntron *trnL* e os espaçadores intergênicos *trnL-trnF* (Lledó et al. 2005). A região do íntron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF* situam-se dentro de regiões com caracteres instrutivos (Shaw et al. 2005). Assim sendo, a combinação dessas regiões tem sido muito utilizada nas análises filogenéticas nos mais diversos níveis taxonômicos, tornando-se apto de identificar variação inter e intraespecífica em diversas espécies vegetais (Tsai et al. 2006).

O gene *matK* possui cerca de 1570 pb e codifica para a proteína maturase, que está envolvida no splicing de íntrons tipo-II de RNA transcritos (Neuhaus e Link 1987). A região codificante de *matK* está geralmente localizada dentro de um íntron classe II, entre os éxons 5' e 3' do gene que codifica o *trnK* (RNA transportador para lisina). A elevada taxa evolutiva característica do *matK* o tornou utilizável em reconstruções filogenéticas em altos níveis taxonômicos, como a ordem ou

família (Lahaye et al. 2008), e às vezes em baixos níveis, como gênero ou espécie, tendo sido muito citado em pesquisas que envolvam DNA Barcode de plantas (Gao et al. 2008).

Para estudos de filogenia e diversidade existem análises fenéticas e cladísticas que são usadas para a construção de árvores de dados obtidos pela utilização de marcadores moleculares (Eymygdio et al. 2003). Para as análises fenéticas que usam medidas de similaridade genética, tem-se o algoritmo UPGMA. Nas análises cladísticas podem ser produzidas árvores para cada caráter.

A Máxima Parcimônia é apoiada no entendimento de que a maior probabilidade de se reconstruir a filogenia se baseia na escolha da hipótese que implica no menor número de etapas para se atingir o resultado final. Ao se praticar esse método, somente parte da informação armazenada nas sequências pode ser recuperada, visto que nem toda variabilidade será empregada como sítios informativos (Nei e Kumar 2000). Na Máxima Verossimilhança sua inferência leva em conta todos os sítios sem distinção (Schneider 2007, Lemey et al. 2009) com fundamento no princípio da verossimilhança, em que dentre todas as topologias possíveis somente a com maior probabilidade será apontada como a mais correta. Para esse fim, dentre as sequências verificadas um modelo é oferecido com sua topologia e comprimento dos ramos levados em consideração (Schneider 2007, Lemey et al. 2009). A inferência Bayesiana fundamenta-se em um método estatístico extremamente relacionado com a máxima verossimilhança. A hipótese perfeita é a que mostra a máxima probabilidade posterior, que é estimada a partir de um modelo evolutivo previamente selecionado. A probabilidade posterior para uma hipótese é dada pela verossimilhança multiplicada pela probabilidade a priori desta hipótese. Este valor pode ser analisado como sendo a probabilidade da árvore estar certa (Huelsenbeck et al. 2001).

Os métodos de distância Neighbor-Joining (NJ) rapidamente produz uma árvore final para enormes filogenias baseadas na evolução mínima. Este método é importante no momento em que o número de sequências a serem verificadas é da ordem de centenas ou milhares (Saitou e Nei 1987). A precisão das árvores NJ é igual a outros métodos mais demorados para conjuntos de dados geralmente curtos (Saitou e Nei 1987). O método NJ produz árvores agrupando sequências vizinhas

de maneira paulatinamente. Nas fases do agrupamento de sequências, ele minimiza a soma dos comprimentos de ramificação e, portanto, verifica muitas topologias. Para enormes conjuntos de dados, o NJ analisa somente uma fração minúscula do número total de topologias possíveis (Tamura et al. 2004).

## 2.5. Bioinformática

A bioinformática é uma grande aliada nas pesquisas de biologia molecular. Ela surgiu como um novo ramo da ciência que tem por finalidade responder a questões biológicas através de análises com ferramentas computacionais (Borém e Santos 2001). Por meio das ferramentas de bioinformática é possível avaliar uma grande variedade de dados biológicos; sendo possível interpretar, armazenar, processar, decifrar estruturas e analisar os programas e algoritmos desenvolvidos com grandes quantidades de informações (Borém e Santos 2001). Uma diversidade de ferramentas computacionais vem sendo produzidas para o volume de dados biológicos gerados. Por isso, a bioinformática tem se tornado útil na agregação de vários dados gerados por estas diferentes tecnologias (Edwards e Batley 2004).

Ao longo das últimas décadas, banco de dados com enorme quantidade de informações (sequências de nucleotídeos, aminoácidos e/ou proteínas) tem sido oferecido à comunidade científica, viabilizando a interação entre diferentes grupos, bem como permissão e depósito de dados e ferramentas importantes para sua manipulação (Morais 2003, Bayat 2002).

O banco de dados biológico mais conhecido é o GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/)), disponível no banco de dados de informações do NCBI (National Center of Biotechnological Information). O GenBank é uma coleção de todas as sequências genéticas publicamente disponíveis; sua base de dados é composta por meio da colaboração internacional com o banco de Dados de DNA do Japão (Bank of Japan - DDBJ), o instituto de Bioinformática Europeu (EMBL) e a comunidade científica, o qual oferece o acervo mais completo de dados de sequências nucleotídicas de diversos exemplos de organismos disponíveis em todo o mundo (Benson et al. 2000, Tateno et al. 2002).

O banco de dados oferece várias ferramentas computacionais com funções particulares, sendo uma das mais utilizadas o BLAST (Basic Alignment Search Tool), um algoritmo fundamentado no método heurístico para a submissão de sequências e posterior alinhamento, através da homologia dessas sequências com as depositadas no GenBank (Gibas e Jambeck 2001). O BLASTn executa pesquisas em sequências de nucleotídeos com banco de dados de sequências também de nucleotídeos (Gibas e Jambeck 2001). O ordenamento se dá por uma análise de trechos semelhantes entre os fragmentos sequenciados. Quando são encontrados fragmentos com pelo menos 14 bases semelhantes, eles são deduzidos como sendo provenientes da mesma região do genoma. É desta maneira que dois fragmentos são alinhados contiguamente, tendo como intuito de fornecer novos conhecimentos com base na grande quantidade de dados que vêm sendo obtidos através das sequências de DNA e proteínas (Gibas e Jambeck 2001).

Encontramos no NCBI a ferramenta ORF-Finder (Open Reading Frame Finder; Identificador de Quadros Abertos de Leitura), com função de traduzir sequências nucleotídicas (DNA/RNA) nos seis quadros abertos de leitura (NCBI 2018). O software CLUSTALw é utilizado em biologia molecular para executar alinhamento múltiplos de sequência de ácidos nucléicos e proteínas e para a preparação de árvores filogenéticas. A nova atualização permite saída no formato NEXUS e FASTA, números de intervalo de impressão e cálculo de árvore mais rápido (Morais 2003, Chenna et al. 2003).

A análise comparativa de sequências sob os princípios da genética evolutiva molecular tornou-se fundamental para investigar similaridades entre sequências de vários organismos, possibilitando a reconstituição da história evolutiva das espécies (Kumar et al. 2004). Com o intuito de facilitar essas análises, o software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al. 2016) vem sendo usado para análise da variação da sequência do DNA e proteínas a partir de uma perspectiva evolucionária. O software dispõe de algoritmos como UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) (Sneath e Sokal 1973), NJ (Neighbor-Joining) (Nei 1973), Máxima Parcimônia (Fitch 1971) e Máxima Verossimilhança (Kumar et al. 2016) possibilitando a realização de inferências filogenéticas.



## 2.6. Filotaxonomia

A pesquisa molecular vem sendo utilizada juntamente com caracteres morfológicos, anatômicos, embriológicos e bioquímicos para resolver problemas taxonômicos em diversos grupos. Amaryllidaceae é uma família cosmopolita constituindo-se como um dos grupos com maior diversidade dentro das monocotiledôneas (Stevens 2014). Marcadores moleculares podem ser do tipo genes nucleares (espaçador transcrito interno ou ITS) e de cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *trnL*, *trnL-F*, *ndhF*, *atpB*), com uso para filogenia (Soltis et al. 1998).

A utilização de marcadores ITS permitiu revelar o não monofiletismo entre os gêneros *Rhodophiala* C. Presl, *Habrathus* Herb e *Zephyranthes* Herb (Merow et al. 2000). O gene nuclear também possibilitou revelar que o gênero *Allium* é monofilético, e que as grandes distâncias genéticas implicam que *Allium* é de origem antiga (Li et al. 2010). Garcia et al. (2014) por meio das sequências de cloroplasto (DNAcp) (3' *ycf1*, *ndhF*, *trnL*) e nuclear (ITS) sugeriu dois clados na tribo Hipeastreae; Traubiinae, formada por *Traubia* Moldenke, *Placea* Miers e *Phycella* Lindl e a tribo Hippeastrinae, abrangendo *Eithea* Ravenna, *Habranthus*, *Hippeastrum*, *Rhodophiala*, *Sprekelia* Heist e *Zephyranthes*. Sequências *ndhF* caracterizou Calostemmateae e Haemantheae como grupos irmãos (Ronsted et al. 2012).

O APG III de 2009 (Souza e Lorenzi 2012) e Chase et al. (2000) por intermédio de informações moleculares e filogenéticas agregou as famílias Alliaceae e Agapanthaceae em Amaryllidaceae, combinando assim três subfamílias: Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae. Agapanthoideae conta com somente o gênero *Agapanthus* como representante, com suas espécies ocorrendo na África do Sul. As espécies se mostram como herbáceas, perenes, rizomatosas, folhas lineares, planas, inflorescências em umbela, flores grandes e vistosas, bissexuadas, hermafroditas, fruto capsular com sementes aladas (Stevens 2014). Allioideae abrange 11 gêneros e 600 espécies e é composta por plantas herbáceas, terrestres, perenes, bulbosas, sendo dividida em três tribos: Allieae Dumortier com um gênero (*Allium*) (Li et al. 2010); Tulbahieae Meisner com dois gêneros (*Tulbaghia* L. e *Prototulbaghia* Vosa); Gilliesieae Baker, com oito gêneros, *Gilliesia* Lindl., *Leucocoryne* Lindl.,

*Miersia* Lindl., *Nothoscordum* Kunth, *Solaria* Phill., *Speea* Loes, *Trichlora* Baker e *Tristagma* Poepp. (=Ipheon) (Sassone e Giussani 2018). Amaryllidoideae compreende cerca de 800 espécies com 70 gêneros em 16 tribos (Meerow e Shijman 2001, Meerow 2009).

## 2.7. Genoma plastidial

As espécies vegetais possuem dois genomas citoplasmáticos: mitocondrial e plastidial. Eles são derivados de eubactérias primitivas de vida livre, a mitocôndria da  $\alpha$ -proteobactéria e o plastídio da cianobactéria (Timmis et al. 2004). O mtDNA apresenta um tamanho relativamente grande e muito variável (200 a 2.400 kb) e uma baixa taxa de substituição nucleotídica (Avisé 2009). O cpDNA no entanto indica um tamanho pequeno, variando entre 120 a 217 kb em plantas fotossintetizantes (Maliga 2004), sendo conservado mesmo entre espécies filogeneticamente distantes (Palmer e Stein 1986).

Estruturalmente o plastoma é formado por uma região de cópia única longa (LSC) e uma região de cópia única pequena (SSC), aonde são separadas por duas regiões de repetições invertidas (IRA e IRB), formando uma estrutura quadripartida (Green 2011). As duas regiões IRs são idênticas em composição, sendo todos os genes contidos nessa região apresentam no mínimo duas cópias por genoma, porém em sentido de leitura contrário. Em geral possui os genes 16S, 23S, 5S e 27 genes tRNA; três genes para a subunidade da RNA polimerase e a maioria dos genes para fotossistema I, fotossistema II, citocromo e síntese de ATP (Green 2011), finalizando 80 proteínas (Huang et al. 2013). As diferenças nos genomas plastidiais estão relacionadas com a presença/ausência de introns, fatores de transcrição, organização física do genoma, incluindo espaços intergênicos e rearranjos (Huang et al. 2013).

Apesar do cpDNA similarmente evoluir em um ritmo lento sempre que comparado ao mtDNA, sua taxa de evolução é geralmente três a quatro vezes maior do que mtDNA de plantas (Avisé 2009). O cpDNA expressa uma estrutura consistente com pouca recombinação intramolecular propiciando o acúmulo de sinais históricos ao longo da evolução das populações (Avisé 2009). Diante

disso, para estudos filogenéticos de plantas, sequências do genoma plastidial são os marcadores moleculares comumente utilizados em plantas (Huang et al. 2013). Na maioria das angiospermas o cpDNA é herdado maternalmente, onde o fluxo de genes maternos dá-se por meio do movimento de sementes, sendo geralmente mais restrito do que o fluxo de genes nucleares, os quais são transportados pelo movimento de pólen e sementes (Petit et al. 2005). É desejado que cpDNA apresente maior estruturação espacial quando comparado a marcadores nucleares, pois ele possui um menor tamanho efetivo quando comparado ao DNA nuclear, devido a haploidia e restrição de fluxo gênico (Petit et al. 2005).

Muitos estudos tem identificado SSRs de cloroplasto dentro de plastomas (Melotto-Passarin et al. 2011). Os cpSSRs tornaram-se um dos marcadores moleculares muito utilizados em genética vegetal. São amplamente utilizados para avaliação da diversidade genética, proteção de variedades, mapeamento molecular e seleção assistida por marcadores, proporcionando ferramenta eficiente para identificação de cultivares (Melotto-Passarin et al. 2011, Caixeta et al. 2013).

Atualmente as sequências completas de nucleotídeos já foram determinadas para o plastoma de centenas de espécies, entre plantas e algas. Estas sequências estão disponíveis no banco de dados do NCBI. Em Amaryllidaceae dezesseis espécies tiveram seus plastomas seqüenciados (NCBI 2018). Estas sequências mais as sequências dos genomas nucleares e mitocondriais depositadas darão suporte a novos avanços científicos nesta área.

## **2.8. Lectina de plantas**

As lectinas são largamente encontradas no reino vegetal abrangendo especialmente as famílias Leguminosae, Algae, Euphorbiaceae, Gramineae, dentre outras. A família Leguminosae compreende a maior parte de lectinas extraídas e isoladas, principalmente das sementes (Loris et al. 1998).

A ação inseticida de muitas lectinas de plantas tem sido demonstrada em ensaios de nutrição *in vitro* e em estudos com plantas transgênicas (Macedo et al. 2004, Macedo et al. 2007). Portanto o

uso das lectinas pode evidenciar genes para a engenharia genética que podem representar um potencial ganho econômico contra pragas na agricultura (Cagliari et al. 2018).

O avanço da biologia estrutural associado com o desenvolvimento de modernas técnicas de DNA recombinante tornou possível classificar lectinas não somente quanto aos aspectos estruturais, mas como também em famílias que estejam evolutivamente relacionadas (Van Damme et al. 1998). Dentre as famílias evolutivamente relacionadas de lectinas de plantas podemos destacar as lectinas de monocotiledôneas de ligação específica à manose. Foram classificadas, até então, em seis diferentes famílias de plantas: Alliaceae, Amaryllidaceae, Araceae, Bromeliaceae, Liliaceae e Orchidaceae (Van Damme et al. 1998).

Em Amaryllidaceae, várias espécies tem sido utilizada em pesquisas para o desenvolvimento de plantas contra herbívoros e patógenos. A lectina anti-inseto mais estudada é a lectina de ligação a manose a partir da espécie *Galanthus nivalis* contra pragas como *Nilaparvata lugens* (gafanhoto marrom) e *Nephotettix cinciteps* (cigarrinha verde) na cultura do arroz (Powell et al. 1995) e *Lacanobia oleracea* na cultura do tomate (Fitches et al. 1997). No gênero *Allium*, a lectina foliar purificada (ASAL) retirada de espécies de *A. sativum* tem se mostrado promissoras contra o crescimento e sobrevivência de importantes pragas como *Lypaphis erysimi* (pulgão-da-mostarda) e *Dysdercus cingulatus* (algodão vermelho) (Bandyopadhyay et al. 2001).

## 2.9. Palinologia

Os grãos de pólen são estruturas reprodutivas masculinas das fanerógamas e se estabelecem na parede do micrósporo mais o microgametófito nela contido (Gasparino e Cruz-Barros 2006).

O uso da palinologia tem fornecido relevantes informações a taxonomia (Silvério e Mariath 2014), filogenia (Judd et al. 2007), estudos paleoecológicos (Kuhn et al. 2017), caracterização botânica vegetal (Wrónska et al. 2013), entre outros. Para que a aplicação da palinologia seja feita nesses campos de estudo é importante o conhecimento sobre a morfologia dos grãos de pólen das plantas (Judd et al. 2007). Devido à grande diversidade morfológica, os grãos de pólen têm sido

utilizados para fins taxonômicos, auxiliando na caracterização morfológica e identificação de algumas espécies para gerar informações filogenéticas que expressam com maior precisão a origem e evolução dos organismos (Judd et al. 2007). As características do pólen são essenciais para a taxonomia, pois os grãos de pólen apresentam a forma, tamanho, cor e ornamentação da exina definida para cada espécie, gênero e família (Silva et al. 2016). O seu conhecimento para programas de melhoramento genético é de grande importância para dimensionar o potencial das espécies nos cruzamentos realizados, aumentando a eficiência na obtenção de híbridos (Pilarek et al. 2013).

Em Amaryllidaceae, estudos palinológicos em geral, fazem parte de catálogos e/ou levantamentos polínicos. Os gêneros mais observados quanto à palinologia são *Crinum* L. (Erdtman 1966, Sharma 1967, Huang 1972), *Hymenocallis* Salisb. (Huang 1972, Alves-Araujo et al. 2007, Bahadur et al. 2017), *Zephyranthes* Herb (Sharma 1967, Alves-Araujo et al. 2007, Bahadur et al. 2017) e *Hippeastrum* (Alves-Araujo et al. 2007, Candido et al. 2013, Bahadur et al. 2017). Na região sul-americana, Candido et al. (2013) e Martín et al. (2012) analisaram os grãos de pólen de espécies de *Hippeastrum*, *Hymenocallis*, *Stenomesson* e *Eucharis* Planch., conseguindo diferenciá-las entre os representantes do gênero.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aleixo A, Burlamaqui T, Goncalves E e Schneider P (2006) Molecular systematics of the Ocellated Woodcreeper complex (Dendrocolaptidae) in tropical South America: Implacations for taxonomy, conservation, and historical biogeograph. **Journal of Ornithology** **147**:125-126.

Alves-Araújo A, Pessoa E e Alves M (2012) Caracterização Morfoanatômica de Espécies de Amaryllidaceae e Alliaceae do nordeste brasileiro. **Revista Caatinga** **25**: 68-81.

Amaral AC (2007) **Amaryllidaceae Jaime St.-Hil.: Levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação in vitro**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília.

Amaral AC (2011) ***Habranthus* Herb. (Amaryllidaceae) no Brasil: estudo taxonômico, caracterização morfológica e relações filogenéticas**. 2011. 167 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília.

Araújo AA, Santos FAR e Alves M (2007) Caracterização palinológica de espécies de Amaryllidaceae sensu stricto ocorrentes no nordeste brasileiro. **Acta Botanica Brasilica** **21**: 967-976.

Avise JC (2009) Phylogeography: Retrospect and prospect. **Journal of Biogeography** **36**: 3-15.

Bahadur S, Ahmad M, Mir S, Zafar M, Sultana S, Ashfaq S e Arfan M (2017) Identification of monocot flora using pollen features through scanning electron microscopy. **Microscopy Research & Technique** **81**: 599-613.

Bandyopadhyay A e Roy S (2001) Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of *Homopteran* pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science** **161**: 1025-1033.

Bastida J, Berkov S, Torras L, Pigni NB, Andrade JP, Martínez V, Codina C e Viladomat F (2011) Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In Muñoz-Torrero D (ed.) **Recent Advances in Pharmaceutical Sciences**. Transworld Research Network, Kerala, p.65-100.

Bastida J, Lavilla R e Viladomat F (2006) Chemical and biological aspects of Narcissus alkaloids. In Cordell GA (ed.) **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, p. 87-179.

Bayat A (2002) Science, medicine, and the future Bioinformatics. **The BMJ** **324**:1018-1022.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman J, Ostell J, Rapp BA e Wheeler DL (2000) GenBank. **Nucleic Acids Research** **28**: 15-18.

Bessa CDPB, Andrade JP, Oliveira RS, Domingos E, Santos H, Romão W, Bastida J e Borges WS (2017) Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae)

using 70 CGC-MS and ambiente ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). **Journal of Brazilian Chemical Society** **28**: 819-830.

Borém A e Santos FR (2001) **Biotecnologia simplificada**. 1ª ed, Editora Suprema. Viçosa, 249p.

Cagliari R, Kremer FS, Pinto LS (2018) Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications, **International Journal of Biological Macromolecules** **119**: 811-820.

Caixeta TE, Ferrão LFV, Maciel-Zambolim E (2013) **Marcadores Moleculares**. In: Borém A. Fritschr-Neto R. Biotecnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas. Visconde do Rio de Janeiro: Suprema. 31-68.

Candido RS, Fourny ACS, Goncalves-Esteves V e Lopes RC (2013) *Hippeastrum* species in areas of restinga in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Botanica Brasilica** **27**: 661-668.

Chase MW, Soltis DE, Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Givnish TJ, Sytsma KJ e Pires JC (2000) Higher-level systematics of monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. In Wilson L e Morrison DA (eds.) **Monocots: Systematics and Evolution**. CSIRO Publishing, Collingwood, p. 3-16.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG e Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research** **31**: 3497-350.

Chu C-C, Wu W-S, Shieh J-P, Chu H-L, Lee C-P e Duh P-D (2017) The anti-inflammatory and vasodilating effects of three selected dietary organic sulfur compounds from *Allium* Species. **Journal of Functional Biomaterials** **8**: 1-14.

Coertze AF e Louw E (1990) The breeding of interspecies and intergenera hybrids in the Amaryllidaceae. **Acta Horticultural** **266**: 349-352.

Dutilh JH, Fernandez EP, Penedo TSA, Moraes MMV e Messina T (2013) Amaryllidaceae In Martinelli G e Moraes MA. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1ª ed. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 126-139.

Edwards D e Batley J (2004) Plant bioinformatics: from genome to phenome. **Trends in Biotechnology** **22**: 232-237.

Emygdio BM, Antunes IF, Choer E e Nedel JL (2003) Eficiência de coeficientes de similaridade em genótipos de feijão mediante marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **38**: 243-250.

Erdtman G (1966) **Pollen morphology and plant taxonomy – Angiosperms**, 2ª ed., Hafner, New York, 553p.

Fałkowska U, Radzka A, Dobryniewska W, Krawiec K e Tchórz M (2018) Evaluation of knowledge of Polish medical students regarding toxic plants. **Polish Journal of Public Health** **28**: 19-25.

Fitches E, Gatehouse AMW e Gatehouse JA (1997) Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. **Journal of Insect Physiology** **43**: 727-739.

Fitch WM (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology** **20**: 406-416.

Flory WS e Smith GL (1980) The chromosomes of *Habranthus martinezii* and *H. robustus* and their hybrid. **Plant Life** **36**: 54-62.

Gao X, Zhu YP, Wu BC, Zhao YM, Chen JQ e Hang YY (2008) Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast matK, rbcL and trnL-F sequences. **Journal of Systematics and Evolution** **46**: 315-321.

García N, Meerow AW, Soltis DE e Soltis PS (2014) Testing deep reticulate evolution in Amaryllidaceae Tribe Hippeastreae (Asparagales) with ITS and chloroplast sequence data. **Systematic Botany** **39**: 75-89.



Gasparino EC e Cruz-Barros MAV (2006) **Palinologia: curso para capacitação de monitores e educadores**. Instituto de Botânica, Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, 9 p. Disponível em:

[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Palinologia\\_Eduardo\\_Gasparino .pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Palinologia_Eduardo_Gasparino.pdf)

Acesso em: 05 out. 2018.

Gibas C e Jambeck P (2001) **Desenvolvendo Bioinformática - Ferramentas de software para aplicações em Biologia**. Editora campus, Rio de Janeiro, 440p.

Gompert Z, Nice CC, Fordyce JA, Forister ML e Shapiro AM (2006) Identifying units for conservation using molecular systematics: the cautionary tale of the Karner blue butterfly. **Molecular Ecology** **15**: 1759-1768.

Goncagul G e Ayaz E (2010) Antimicrobial Effect of Garlic (*Allium sativum*). **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery** **5**: 91-3.

Graur D e Li W (2000) **Fundamentals of Molecular Evolution**. 2a edição, Sinauer Press. Sunderland, 481p.

Green BR (2011) Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. **The Plant Journal** **66**: 34-44.

Hodge G, Hodge S e Han P (2002) *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: Potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. **Cytometry** **48**: 209-215.

Huang YY, Matzke AJM e Matzke M (2013) Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of coconut Palm (*Cocos nucifera*). **Plos One** **8**: 1-12.

Huang T-C (1972) **Pollen flora of Taiwan**. 1st ed, National Taiwan University, Taipei, 106p.

Hueselbeck JP, Ronquist F, Nielsen R e Bollback JP (2001) Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. **Science** **294**: 2310-2314.

Husti A e Cantor M (2015) Sacred Connection of Ornamental Flowers with Religious Symbols.

**ProEnvironmental 8: 73-79.**

Jin Z (2009) Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. **Natural Products Reports 26: 363-381.**

Jin Z (2011) Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. **Natural Products Reports 28: 1126-1142.**

Jin Z (2016) Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. **Natural Products Reports 33: 1318-1343.**

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF e Donoghue MJ (2002) **Plant systematics: a phylogenetic approach.** 2<sup>a</sup> ed, Sinauer Associates, Sunderland, 576p.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF e Donoghue MJ (2007) **Plant systematics: a phylogenetic approach.** 3<sup>a</sup> ed, Sinauer Associates, Sunderland, 611p.

Karehed J e Bremer B (2007) The systematics of Knoxiaceae (Rubiaceae)-molecular data and their taxonomic consequences. **Taxon 56:1051-1076.**

Kim JH, Kim DK, Forest F, Fay MF e Chase MW (2010) Molecular phylogenetics of *Ruscaceae sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Annals of Botany 106: 775-790.**

Kuhn LA, Souza PA, Rodrigo R e Cancelli WG (2017) Paleoenvironmental evolution of the coastal plain of Southern Brazil: palynological data from a Holocene core in Santa Catarina State. **Anais da Academia Brasileira de Ciências 89: 2581-2595.**

Kumar S, Tamura K e Nei M (2004) MEGA3: an integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings In Bioinformatics 5: 150-163.**

Kumar S, Stecher G e Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.**

Kwembeya EG, Bjora CS, Stedjeb B e Nordal I (2007) Phylogenetic relationship in the genus *Crinum* (Amaryllidaceae) with emphasis on tropical African species: evidence from trnL-F and nuclear ITS DNA sequence data. **Taxon** **56**: 801-810.

Lahaye R, Van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG e Savolainen V (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **105**: 2923-2928.

Leighton FM (1965) The genus *Agapanthus* L'Hérit. **Journal of South African Botany** **4**: 1-50.

Lemey P, Salemi M e Van Damme A-M (2009) **The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing**. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, p.750.

Li Qin-Qin, Song-Dong Zhou, Xing-Jin He, Yan Yu, Yu-Cheng Zhang, Xian-Qin Wei (2010) Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *rps16* sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. **Annals of Botany**. 106: 709-733.

Lledó MD, Crespo MB, Fay MF e Chase MW (2005) Molecular phylogenetics of *Limonium* (Plumbaginaceae): Biogeographical and systematic implications. **American Journal of Botany** **92**: 1189-1198.

Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J e Wyns L (1998) Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta** **1383**: 9-36.

Macedo MLR, Freire MGM e Castro MM (2004) Mechanisms of the insecticidal action of TEL (*Talisia esculenta* lectin) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **56**: 84-96.

Macedo MLR, Freire MGM, Silva MBR e Coelho LCBB (2007) Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepitoptera: Pyralidae), *Zabrotes*

*fuscasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Pruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology** **146**: 486-498.

Maira N, Torres TM, Oliveira AL, Medeiros SRB, Agnez LF, Lima JPMS e Scortecci KC (2013) Identification, characterisation and molecular modelling of two AP endonucleases from base excision repairs pathway in sugarcane provide insights on the early evolution of green plants. **Plant biology** **16**: 622-631.

Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology** **55**: 289-313.

Martín J, Raymúndez M, Vallès J, Garnatje T e Raimúndez E (2012) Palynological study of the Venezuelan species of the genus *Hymenocallis* (Amaryllidaceae). **Plant Systematics and Evolution** **298**: 695-701.

Meerow AW, Guy CL, Li Q-B e Yang S-L (2000) Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on rDNA ITS sequences. **Systematic Botany** **25**: 708-726.

Meerow AW e Snijman DA (2006) The never-ending story: multigene approaches to the phylogeny of Amaryllidaceae, and assessing its familial limits. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany** **22**: 353-364.

Meerow AW (2009) Neotropical Amaryllidaceae. In Milliken W, Klitgård B e Baracat A. **Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics**. Disponível: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Amaryllidaceae.htm> Acesso: 25 Dez 2018.

Melhem TS, Cruz-Barros MAV, Corrêa MAS, Makino-Watanabe H, Silvestre Capelato MSF e Golçalves-Esteves VL (2003) Variabilidade Polínica em Plantas de Campos do Jordão. **Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo** **16**: 1-104.

Melotto-passarin DM, Tambarussi EV, Dressan K, De Martin VF, Carrer H (2011) Characterization of Chloroplast DNA microsatellites from *Saccharum* spp. And related species. **Genet Mol Res** 10: 2024-2033.

Morais DAL (2003) Análise bioinformática de genes de resistência à patógenos no genoma expresso da cana-de-açúcar. Tese de Mestrado. UFPE. Recife.

NCBI- National Center for Biotechnology Information (2018) Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 4 jun 2018.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America** 70: 3321-3323.

Nei M e Kumar S (2000) **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 333p.

Neuhaus H e Link G (1987) The chloroplast tRNA Lys (UUU) gene from mustard (*Sinapis alba*) contains a class II intron potentially coding for a maturase-related polypeptide. **Current Genetics** 11: 251-257.

Nicastro HL, Ross SA e Milner JA (2015) Garlic and onions: their cancer prevention properties. **Cancer Prevention Research** 8: 181-189.

Oliveira RS, Dutihl JHA e Sano PT (2010) *Habranthus* (Amaryllidaceae) da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais e Bahia-Brasil. **Rodriguésia** 61: 491-503.

Oliveira VR, Reis A, Boiteux LS, Valêncio AGB e Moura KJ (2004) Reação de populações de cebola a fase foliar da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). In Congresso Brasileiro de Olericultura 44, **Anais ABH** (CD-ROM).

Otves C, Arsene GG e Neacșu A (2016) Species diversity of the plants found in the Roman-Catholic and Orthodox cemeteries (from the Mehala neighbourhood) and the heroes cemetery from Timisoara. **Research Journal of Agricultural Science** 48: 1-11.

Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, Andrade JP, Dutilh J, Bastida J, Cammarota M e Zuanazzi JA

(2010) Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and phytopharmacology* **17**: 698-701.

Palmer JD e Steins DB (1986) Conservation of chloroplast genome structure among vascular plants. *Current Genetics* **10**:823-833.

Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D e Vendramin CG (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* **14**: 689-701.

Pilarek DW, Bocianowski J, Jagodziński AM (2013) Pollen Features of Selected *Crataegus* Taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* **172**: 555-571.

Powell KS, Gatehouse AMR, Hidler VA e Gatehouse JA (1995) Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **75**: 51-59.

Raymúndez MU, Escala MJ e Enrech NX (2008) Microsporogenesis in *Hymenocallis caribaea* (L.) Herb. (Amaryllidaceae) *Acta Botanica Venezuelica* **31**: 409-424.

Rønsted N, Symonds MRE, Birkholm T, Christensen SB, Meerow AW, Molander M, Mølgaard P, Petersen G, Rasmussen N, Van Standen J, Stafford GI, Jäger AK (2012) Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae. *BMC Evolutionary Biology* **12**: 1-12.

Saitou N e Nei M (1987) O método de união de vizinhos: um novo método para reconstruir árvores filogenéticas. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-25.

Salamin N, Hodkinson TR e Savolainen V (2005) Towards building the tree of life: a simulation study for all angiosperm genera. *Systematic Biology* **54**: 183-196.

Sassone B e Giussani LM (2018) Reconstructing the phylogenetic history of the tribe Leucocoryneae (Allioideae): Reticulate evolution and diversification in South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **127**: 437-448.

Schneider H (2007) **Métodos de Análise Filogenética: Um Guia Prático**. 3<sup>a</sup> ed, Holos Editora Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 200p.

Schwingshackl L, Missbach B e Hoffmann G (2016) An umbrella review of garlic intake and risk of cardiovascular disease. **Phytomedicine** **15**: 1127-113.

Sharma M (1967) Pollen morphology of Indian monocotyledons. **Journal of Palynology** **1**: 1-98.

Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE e Small RL (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany** **92**:142-166.

Sharon N e Lis H (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** **14**: 53-62.

Shori AB, Baba, AS, Misran M e Tan HW (2014) Influence of *Allium sativum* or *Cinnamomum verum* on Physicochemical Characteristics of Yogurt. **International Journal of Dairy Science** **9**: 45-55.

Silva VJD, Ribeiro AP e Faria APG (2016) Ultraestrutura e morfologia do pólen de espécies de Bromeliaceae da Mata Atlântica no Sudeste do Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **88**: 439-449.

Silvério A e Mariath J (2014) Comparative structure of the pollen in species of Passiflora: insights from the pollen wall and cytoplasm contents. **Plant Systematic Evolution** **300**: 347-358.

Sneath PH e Sokal RR (1973) **Numerical Taxonomy**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, 573p.

Soltis DE, Soltis PS, Mort ME, Chase MW, Savolainen V, Hoot SB, Morton CM (1998) Inferring complex phylogenies using parsimony: an empirical approach using three large DNA data sets for angiosperms. **Systematic Biology** 47: 32-42.

Souza VC e Lorenzi H (2012) **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGIII. 3ª ed. Editora Plantarum, São Paulo, 768 p.

Srinivasan D, Sangeetha N, Suresh T e Lakshmanaperumalsamy P (2001) Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology** 74: 217-220.

Stafford GI, Wikkelsø MJ, Nancke L, Jäger AK, Möller M e Rønsted N (2016) The first phylogenetic hypothesis for the southern African endemic genus *Tulbaghia* (Amaryllidaceae, Allioideae) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society** 181: 156-170.

Strydom A (2005) **Phylogenetic relationships in the family Amaryllidaceae**. 2005. 559 f. Thesis (Philosophiae Doctor in the Faculty of Natural and Agricultural Sciences) – University of the Free State, Bloemfontein.

Tamura K, Nei M e Kumar S (2004) Perspectivas para inferir filogenias muito grandes usando o método neighbor-joining. **Proceedings da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América**. 101: 11030-5.

Tateno Y, Imanishi T, Miyazaki S, Fukami-Kobayashi K, Saitou N, Sugawara H e Gojobori T (2002) DNA databank of Japan (DDBJ) for genome scale research in life science. **Nucleic Acids Research** 25: 4876-4882.

Thangavelu R, Ganga Devi P, Gopi M, Mustaffa MM (2013) Management of Eumusae leaf spot disease of banana caused by *Mycosphaerella eumusae* with Zimmu (*Allium sativum* x *Allium cepa*) leaf extract. **Crop Protection** 46: 100-105.



Timmis JN, Ayliffe MA, Huang CY e Martin W (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. **Nature Reviews Genetics 5**: 123-135.

Tombolato AFC (2004) **Cultivo Comercial de Plantas Ornamentais**. C&M, Campinas. 211p.

Tsai LC, Yu YC, Hsieh HM, Wang JC e Linacre A (2006) Species identification using sequences of the trnL intron and the trnL-trnF IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. **Forensic Science International 164**: 193-200.

Tsai Y, Cole LL, Davis LE, Lockwood SJ, Simmons V e Wild GC (1985) Antiviral properties of garlic: in vitro effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. **Planta Medica 8**: 460-461.

Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A e Rougé P (1998) Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences 17**: 575-692.

Van Goietsenoven G, Mathieu V, Lefranc F, Kornienko A, Evidente A e Kiss R (2012) Narciclasine as well as other Amaryllidaceae isocarbostryils are promising GTP-ase targeting agents against brain cancers. **Medicinal Research Reviews 33**: 439-455.

Wrońska PD, Bocianowski J e Jagodziński AM (2013) Pollen Features of Selected *Crataegus* Taxa. **Botanical Journal of the Linnean Society 172**: 555-571.

**Caracterização *in silico* e análise filogenética de uma lectina manose  
específica em espécies do gênero *Allium*.**

---

**CAPÍTULO II**

**Artigo Submetido à Revista GMR (Genetics and Molecular Research) (Qualis A2)**

**Caracterização *in silico* e análise filogenética de uma lectina manose-específica em espécies do gênero *Allium*.**

Horace José Jimenez<sup>1,3</sup>; Rômulo Maciel de Moraes Filho<sup>1,3</sup>; Luiza Suely Sêmen Martins<sup>2,3</sup>;  
Reginaldo de Carvalho<sup>2,3</sup>; Angélica Virginia Valois Montarroyos<sup>1</sup>

**RESUMO**

O gênero *Allium* se destaca por suas espécies com utilização na alimentação humana e também por suas espécies medicinais. O gênero possui mais de 800 espécies e se distribuindo do Círculo Polar Ártico até Europa, Ásia, América do Norte e África. Muitos representantes da família Amaryllidaceae são conhecidos por possuírem lectinas de ligação específica à Manose (LMEs). Nos vegetais, as lectinas agem como depósitos de proteínas que podem ser impulsionados para o crescimento e desenvolvimento das plantas e também na defesa contra herbívoros e patógenos. No trabalho presente foram caracterizadas 22 sequências da proteína LME de espécies do gênero *Allium* e de outros representantes da família Amaryllidaceae presentes em bancos de dados públicos. Os resultados obtidos indicaram a presença de dois motivos funcionais conservados nas sequências da LME. Foi observado que para todas as espécies a LME apresentou caráter hidrofílico e apresentou uma grande variação de pI entre as espécies analisadas. A análise filogenética não apresentou consistência com a classificação taxonômica das espécies avaliadas a nível infragenérico. No entanto os métodos se mostraram suficientes para a separação até o nível de tribos dentro da família Amaryllidaceae. Os modelos 3D gerados proporcionarão um melhor entendimento de suas estruturas terciárias e funções moleculares.

**Palavras-chaves:** Bioinformática; Modelagem por homologia; Domínios conservados.

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil. <sup>2</sup> Departamento de Biologia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas; Departamento de Agronomia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil. Autor para correspondência e-mail: horacejimenez@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

The *Allium* genus stands out for its species used in human food and also for its medicinal properties. The genus has more than 800 species and is distributed from the Arctic Circle to Europe, Asia, North America and Africa. Many representatives of the Amaryllidaceae family are known for producing Mannose specific lectins (MSL). In plants, lectins act as deposits of proteins that can be used for plant growth and development and also in defense against herbivores and pathogens. In the present work, 22 sequences of the MSL protein were characterized from species of the *Allium* genus and from other representatives of the Amaryllidaceae family present in public databases. The results indicated the presence of two conserved functional motifs in the MSL sequences. It was observed that for all species the MSL was of hydrophilic character and exhibited a great variation in their isoelectric points. The phylogenetic analysis was not consistent with the taxonomic classification of the species evaluated at the infrageneric level. However, the methods proved sufficient for the separation up to the level of tribes within the Amaryllidaceae family. The generated 3D models will also provide a better understanding of their tertiary structures and molecular functions.

**Key Words:** Bioinformatics; Homology modeling; Canned domains

## INTRODUÇÃO

O gênero *Allium* é o mais numeroso da subfamília Allioideae, e contém mais de 800 espécies, sendo assim um dos maiores gêneros dentre as monocotiledôneas. As espécies desse gênero estão presentes em todo o mundo distribuindo-se do Círculo Polar Ártico até Europa, Ásia, América do Norte e África (Rahn 1998, Fritsch et al. 2010). *Allium* tem um centro de origem que se estende da bacia do mediterrâneo até a Ásia central e um menos importante localizado no oeste da América do norte (Li et al. 2010). O número cromossômico básico do grupo é  $n=8$ , no entanto, variações em ploidia ( $2n=14-68$ ) e outros números básicos ( $n=7, 9, 10$  e  $11$ ) podem ocorrer (Fritsch et al. 1998, Zhou et al. 2007).

As espécies deste gênero são largamente utilizadas na alimentação, especialmente, *A. cepa*, *A. sativum*, *A. fistulosum*, *A. schoenoprasum* e *A. ampeloprasum* (Souza 2012). Alguns representantes do gênero têm propriedades anti-inflamatória, vermífuga, antisséptica, diurética, hipotensora e antitérmica, e produzem alicina e garlicina, que lhe conferem propriedades antibacterianas (Harris et al. 2001, Benkeblia 2003). Muitos representantes da família botânica Alliaceae se destacam por conter lectinas de ligação específica à Manose (Smeets et al. 1997). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que contêm ao menos um sítio de ligação a carboidratos sem manifestar utilidade catalítica nem características imunológicas (Sharon et al. 2004), onde se unem reversivelmente a mono e oligossacarídeos de glicoconjugados eucarióticos (Vasconcelos et al. 2009). A primeira lectina descoberta foi da planta *Ricinus communis* em 1888, sendo denominada ricina, quando se estudava os efeitos tóxicos do extrato desta planta (Franz 1988, Sharon et al. 2004).

Em relação à estrutura tridimensional as lectinas vegetais têm sido subdivididas em: apenas um domínio de ligação a carboidrato e de pequeno tamanho (merolectinas), dois ou mais domínios de ligação idênticos (hololectinas), no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos diferentes (superlectinas), um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio que exerce atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos (quimerolectinas) (Van damme et al. 1998, Vandendorre et al. 2011). Existem também as que possuem dois ou mais sítios idênticos de ligação a açúcares (multilectinas). Desde sua descoberta as lectinas mostraram um grande número de propriedades químicas e biológicas, o que tem permitido sua utilização para investigação estrutural e funcional de carboidratos, especialmente glicoproteínas, e para verificar variações que ocorrem na superfície celular (Sharon et al. 2004).

Elas podem ser observadas em micro-organismos, plantas e animais, sendo capazes de estar na membrana ou dentro da célula. Lectinas endógenas mediam processos biológicos como reconhecimento célula-célula, interações da matriz extracelular, fertilização gamética, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interação parasita-hospedeiro,

enovelamento e direcionamento de glicoproteína, indução mitogênica e homeostase (Ghazarian et al. 2011), e tem atraído grande interesse devido a sua variedade de atividades biológicas como na aglutinação celular (Khan et al. 2007), antitumoral (Liu et al. 2012), imunomodulatória (Rubinstein et al. 2004), antifúngica (Herre et al. 2004) e efeitos antivirais (Zuo et al. 2002). Nos últimos anos, tornou-se claro que as lectinas exercem dois papéis principais nas plantas. Primeiro, eles são depósitos de proteínas que podem ser impulsionados para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e em segundo, na defesa de plantas contra herbívoros e patógenos (Vandenborre et al. 2011, Barre et al. 2002, Dias et al. 2015, Troegeler et al. 2017).

As lectinas normalmente ocorrem mais abundantemente em sementes e tecidos de armazenamento vegetativo onde são vistos em organelas subcelular com função de armazenamento. As lectinas se acumulam durante o crescimento e desenvolvimento ou fase reprodutiva do ciclo de vida da planta e são mobilizados e utilizados mais tarde (Vandenborre et al. 2011, Barre et al. 2002, Dias et al. 2015, Peumans et al. 1995, Follmer et al. 2004). Os genes que codificam proteínas têm algumas regiões que, devido à sua importância funcional ou estrutural, são muito bem conservadas, enquanto outras regiões evoluem mais rápido em termos de substituições e inserções ou deleções de nucleotídeos (Watson et al. 2005). Para compreender o papel das proteínas dentro de grupos de organismos, estudos filogenéticos podem ajudar a esclarecer questões sobre como as proteínas estão relacionadas em diferentes espécies, e se elas podem ter evoluído a partir de um ancestral comum (Kasap et al. 2010, Andrade et al. 2011). Atualmente, os resultados filogenéticos são continuamente aperfeiçoados devido à crescente disponibilidade de uma grande quantidade de dados biológicos e a novas abordagens para analisá-los (Kasap et al. 2010, Andrade et al. 2011).

Este trabalho teve como objetivos: (1) Caracterizar, comparar e identificar domínios conservados, em sequências de aminoácidos de uma lectina manose específica do gênero *Allium* disponíveis em bancos de dados públicos. (2) Realizar uma análise filogenética baseada nas sequências encontradas, para compreensão das relações entre espécies do gênero e também ao nível da família Amaryllidaceae. (3) Desenvolver modelos tridimensionais da lectina de representantes do

gênero *Allium*, com base na metodologia de modelagem por homologia, de forma a possibilitar uma melhor compreensão de suas estruturas e funções moleculares. Esta análise comparativa fornecerá informações teóricas valiosas para futuros estudos envolvendo estas proteínas, considerando seu efetivo potencial para uso em estudos filogenéticos e resistência da planta à ação dos insetos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Recuperação das sequências**

As sequências da Lectina manose-específica (LME) foram obtidas através do algoritmo de busca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Sequências de proteínas em *allium* foram recuperadas pela ferramenta BLASTp para procurar os homólogos de proteínas de *allium*, onde um total de 22 sequências foram encontradas (Tabela 1).

### **Análise das Sequências**

Parâmetros físico-químicos das LMEs presentes em espécies da família Amaryllidaceae foram analisadas pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger et al. 2005). A presença de sítios de clivagem de peptídeos de sinal foi investigada usando o servidor TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/pred>) (Tsirigos et al. 2015). A identificação dos domínios funcionais da proteína, sua classificação e ontologia foram realizadas com o uso do servidor Prodom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/>) (Servant et al. 2002), uma base de dados de família de domínios de proteínas de segmentos homólogos. A estimativa dos efeitos funcionais ocasionados por mutações de sequências de aminoácidos fora obtida por meio do servidor SNAP2 (<https://roslab.org/services/snap2web/>) (Hecht et al. 2015).

### **Análise Filogenética e Agrupamento**

As sequências da proteína foram alinhadas utilizando-se o algoritmo ClustalW e as árvores filogenéticas foram produzidas no software MEGA 7.0.21 (Kumar et al. 2016). As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de Máxima parcimônia (MP) com um teste de bootstrap com 1000 réplicas.

### **Previsão, Avaliação e Validação da Estrutura Terciária dos Modelos**

A previsão da estrutura terciária dos modelos 3-D das LMEs foi realizada pelo software Phyre2 (<http://www.sbg.bio. Ic.ac.uk/phyre2>) (Kelley et al. 2015) no modo multi-template. Este servidor utiliza-se métodos avançados de detecção de homologia para construir um modelo 3D. A estrutura 3D da proteína foi então visualizada pelo pacote UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004). A qualidade do modelo foi avaliada usando o servidor Molprobitry (<http://molprobitry.biochem. duke.edu/>) (Chen et al. 2010) pela análise de Ramachandran. O Z-score foi calculado utilizando o servidor interativo ProSA-web (<https://prosa.services.come.sbg.ac.at/prosa.php>) para reconhecer erros em estruturas tridimensionais (Wiederstein et al. 2007). Minimização de energia e correção de pequenos erros no modelo tridimensional foram realizados pelo servidor Yasara force Field (Krieger et al. 2009) e pelo software KiNG (Chen et al. 2009).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Neste estudo, analisamos seqüências da LME em diversas espécies do gênero *Allium*, a partir de seqüências de proteínas foram recuperadas do banco de dados do NCBI. As propriedades físico-químicas das seqüências de proteína foram analisadas pelo servidor ProtParam. A Tabela 1 mostra o peso molecular, o ponto teórico isoelétrico (pI) e a média de hidropaticidade (GRAVY) das seqüências protéicas avaliadas.

O ponto isoelétrico (pI) é importante para a solubilidade, localização subcelular e interação de uma proteína. Em pHs distintos do ponto isoelétrico a solubilidade proteica amplia, devido ao



surgimento de cargas positivas ou negativas sobre as cadeias de proteínas, que favorecem a interação carga-momento do dipolo da água. No momento em que uma solução proteica está no seu estado isoelétrico, isto é, quando a proteína manifesta carga líquida nula num sistema aquoso, as interações proteína-proteína aumentam, assim sendo, menos água interage com as moléculas de proteína, o que faz com que suas moléculas se aproximem, agreguem e precipitem (Carneiro 1997, Vojdani 1996). O conhecimento do pI de uma proteína é de grande importância, visto que, com base nele, pode-se prever a carga líquida da proteína em um determinado pH, o que será muito importante para prática de estudos experimentais como no processo de purificação proteica e manutenção da mesma em uma solução que favoreça sua manutenção na forma solúvel.

Existe uma correlação entre a localização subcelular e o pI de uma proteína (Andrade et al. 1998, Nandi et al. 2006). Geralmente as proteínas no citoplasma possui ponto isoelétrico ( $pI < 7,4$ ), enquanto aqueles no núcleo têm um mais neutro ( $7,4 < pI < 8,1$ ) (Andrade et al. 1998, Nandi et al. 2006). Também foi demonstrado que o pI pode variar muito, dependendo da inserção e deleções entre ortólogos, e da ecologia do organismo (Kiraga et al. 2007).

O ponto isoelétrico das sequências ficou entre 4,65 (*A. ramosum*) e 8,96 (*A. altaicum*), indicando que provavelmente esta lectina exibe uma grande variação de pH ótimo para atuação entre as espécies analisadas. A média de hidropaticidade indica solubilidade, com valores positivos para proteínas hidrofóbicas e negativos para proteínas hidrofílicas. As sequências variaram em tamanho a partir de 138 (*A. ursinum*) a 159 (*A. pskemense*) aminoácidos. A média de hidropaticidade variou de -0.295 (*A. tuberosum*) a -0.028 (*A. altaicum*), o que indica que esta proteína é de caráter hidrofílico para todas as espécies. O peso molecular variou de 14.83kDa (*A. ursinum*) a 16.82kDa (*A. pskemense*). O peso molecular é empregado na cromatografia e eletroforese, por exemplo, para isolar proteínas. No entanto, não é possível fazer generalizações a seu respeito em relação a funções protéicas (Nelson et al. 2005).

O alinhamento múltiplo de sequências é mostrado na Figura 1. A região contornada indica localização do peptídeo sinal. No alinhamento observado, foi possível verificar regiões de alta similaridade, onde a maior parte das posições apresentou conservação entre as sequências analisadas.

Para a caracterização funcional da LME e previsão dos efeitos funcionais de mutações, foram selecionadas cinco espécies (Figura 2). Foi identificada a existência de dois domínios funcionais: PD330654 e PD585253 nas sequências de aminoácidos da lectina manose-específica. O domínio funcional PD330654 foi encontrado em todas as sequências observadas e está associado com funções de ligação de manose, ligação de monômero de actina e reconhecimento de pólen, sendo um componente integral da membrana o que indica sua relevância para o desempenho da proteína. Não foram encontradas informações no servidor sobre as atividades do domínio PD585253. O servidor SNAP2 mostrou que os domínios funcionais PD330654 e PD585253 são as regiões da proteína mais sensíveis a mutações. Este servidor forneceu um mapa com a presença de tonalidades diferentes com possível substituição em cada posição dessas proteínas. A coloração vermelha sinaliza sinais fortes para mutação, coloração branca apresenta indicador de baixo efeito e a coloração azul indica neutralidade. A ocorrência de uma maior quantidade de sítios sensíveis a mutações no domínio PD330654, explica sua conservação e ocorrência em todas as sequências analisadas.

Nas análises filogenéticas, o gênero *Allium* mostrou-se monofilético e robustamente separado das espécies externas (Figura 3). Vários clados foram encontrados em *Allium*, compreendendo espécies de subgêneros *Cepa*, *Allium*, *Polyprason*, *Butomissa*, *Rhizirideum* (representantes da 3ª linhagem evolutiva do gênero) e *Amerallium* (representante da 1ª linhagem evolutiva do gênero). Os principais clados resultantes da análise foram semelhantes aos observados (Li et al. 2010). No clado *Amerallium* foi possível observar que as espécies *A. triquetrum* (Seção *Briseis*) e *A. ursinum* (Seção *Arctoprasum*) apresentaram um grupo isolado na árvore filogenética (BP=23%), estando próximos também da espécie *A. hookeri* (Seção *Bromatorrhiza*). Em comparação aos resultados encontrados por meio de marcadores ITS pra esse gênero (Li et al. 2010), os autores encontram relação entre espécies das Seções *Briseis* (*A. triquetrum*), *Arctoprasum* (*A. ursinum*) e *Bromatorrhiza*

(*A. hookeri*). As espécies do clado *Amerallium* utilizadas neste estudo representam dois grupos relativamente pequenos do Mediterrâneo e da Ásia Oriental, pertencendo assim ao clado do Velho Mundo. No entanto, *Amerallium* é um dos subgêneros principais na linha evolutiva na evolução do *Allium* sendo extremamente diversificado morfológicamente e ecologicamente (Li et al. 2010). *Amerallium* engloba três grupos geográficos distintos: um composto-se de todas as espécies de *Allium* nativas da América do Norte e o restante englobando dois grupos menores da região do Mediterrâneo e leste da Ásia (Li et al. 2010).

O clado *Butomissa* abrangeu as espécies *A. tuberosum*, *A. ramosum* e *A. oreoprasum*, onde foi possível observar que as espécies *A. tuberosum* e *A. ramosum* foram agrupados junto com *A. scorodoprasum* e *A. albidum*, que pertencem aos subgêneros *Allium* e *Rhizirideum* respectivamente. O agrupamento de espécies dos subgêneros *Allium* e *Butomissa* também foi observado em análises prévias (Li et al. 2010), onde os autores indicam que espécies do subgênero *Allium*, seção *Allium* (*A. heldreichii*) podem apresentar relações filogenéticas próximas com *A. tuberosum* (BP=61%). O autor sugere que sequências adicionais de múltiplos exemplares seriam importantes para testar essa relação. Nossos resultados mostraram que espécies do clado *Butomissa* apresentaram proximidade na árvore filogenética com representantes do clado *Rhizirideum*. *Butomissa* ocupa uma posição entre representantes mais próximos do subgênero *Rhizirideum* (Li et al. 2010) e foi observado que a forma de crescimento e a morfologia dos cromossomos de espécies do clado *Butomissa* são semelhantes as do clado *Rhizirideum* (*A. angulosum*, *A. albidum* e *A. senescens*) (Kruse et al. 1992, Friesen et al. 1998).

O clado *Rhizirideum* abrangeu as espécies *A. angulosum*, *A. albidum* e *A. senescens*, que formaram agrupamento na árvore filogenética. Análises com marcadores ITS mostram que a seção *Rhizirideum* forma politomias e a sua relação é para além da resolução por estes marcadores, apresentando assim problemas quanto a sua filogenia (Li et al. 2010). Pequenos estágios de tempo entre ocorrências de especiação esclareceriam prontamente as politomias visualizadas na seção *Rhizirideum*, e a ocorrência do complexo poliploide no grupo de *A. senescens* poderia estar

relacionada à origem recente dessas espécies (He et al. 1999). Nossos resultados mostraram que espécies dos subgêneros *Allium*, *Cepa* e *Polyprason* formaram monofilétismo ao longo da árvore filogenética. No entanto observações anteriores sugerem que esses subgêneros não são monofiléticos, indicando assim reconsiderar a posição sistemática de algumas espécies (Li et al. 2010).

Reconstruções filogenéticas com base em proteínas têm sido largamente utilizadas para elucidar o papel das proteínas dentro de grupos de organismos. Estudos filogenéticos podem ajudar a esclarecer questões sobre como as proteínas estão relacionadas em diferentes espécies, e se elas podem ter evoluído a partir de um ancestral comum (Kasap et al. 2010, Andrade et al. 2011, Van Holle et al. 2017, Moraes Filho et al. 2016). Filogenias baseadas em algumas famílias de lectinas demonstram similaridade com a filogenia das angiospermas (Van Holle et al. 2017).

A Figura 4 ilustra a reconstrução filogenética de Amaryllidaceae com a inclusão de espécies da subfamília Amaryllidoideae, com representantes das tribos Amaryllideae, Hippeastreae, Galantheae, Narcisseae, Haemantheae e Lycorideae. A filogenia obtida está de acordo com a classificação botânica APG-IV, indicando que o uso de sequências da lectina em questão é adequado para a separação das espécies até o nível de tribo.

Para predição da estrutura terciária da proteína pelo servidor Phyre2, foram selecionadas as sequências da lectina das espécies *A. sativum* e *A. ursinum*, representantes das duas linhas evolutivas do gênero *Allium* contempladas no banco de dados (Figura 5).

Após o refinamento das estruturas 3D pelo software KiNG e pelo Servidor Yasara Force Field, os modelos foram avaliados pelo servidor MOLPROBITY, para o reconhecimento de erros na previsão da estrutura terciária. Onde modelos refinados apresentaram 93,29% e 94,12% de resíduos de aminoácidos nas regiões favorecidas por análise do gráfico de Ramachandran para as espécies *A. sativum* e *A. ursinum* respectivamente. Os valores de Z-score avaliados pelo servidor ProSa foram de -4,94 e -5,36 para *A. sativum* e *A. ursinum* respectivamente (Figura 6). Os Z-score das estruturas de proteínas são amplamente utilizados porque caracterizam a energia conformacional das proteínas, e indicam qualidade geral do modelo. Um valor de Z-score negativo é esperado para um bom modelo

(Zhang et al. 1998), porém o mais importante é que o ponto preto representado no gráfico esteja dentro da região azul.

A lectina manose-específica tem um papel importante na defesa de plantas contra herbívoros e patógenos (Murdock et al. 2002), sendo tóxicas para alguns afídeos e insetos sugadores (Rahbe et al. 1995). A atividade inseticida de lectinas vegetais contra uma grande variedade de espécies de insetos pertencentes à ordem Coleoptera, Hemíptera, Díptera e Lepidóptera são bem documentada (Powell et al. 1995). Elas se ligam a glicoproteínas na matriz peritrófica ou outro revestimento membranoso do intestino médio de inseto para paralisar os processos digestivos e a absorção de nutrientes. Esta natureza aponta um potencial uso de lectinas vegetais como um inseticida natural contra um número de pragas nocivas. Com essa característica anti-inseticida, algumas lectinas vegetais são fortes postulantes para a engenharia de plantas com resistência a insetos (Dutta et al. 2005).

Na família Amaryllidaceae, a lectina anti-inseto mais estudada é a lectina de ligação a manose da espécie *Galanthus nivalis*. Powell et al. (1995) observou deterrência na alimentação da cigarrinha marron de arroz (*Nilaparvata lugens*) por meio de dietas artificiais com a lectina de *G. nivalis*. Por meio de imunomarcação verificou-se que a lectina foi capaz de atravessar a barreira epitelial do intestino médio e passar para o sistema circulatório do inseto, resultando em um efeito tóxico sistêmico. Estudos de microscopia eletrônica mostraram mudanças morfológicas na região do intestino médio de gafanhotos alimentados, o que indicam a possibilidade do uso da lectina manose específica de espécies do gênero *Allium* como um potente agente de controle para projetar plantas cultivadas para resistência a insetos. O entendimento das funções da lectina manose-específica neste processo é de grande importância para estudos sobre a interação planta-hospedeiro.

Lectinas também são relatadas como fatores de aceleração de germinação de pólen reduzindo o tempo de emergência do tubo polínico e também no reconhecimento pólen-pistilo (Southworth 1975, Sousa 2015). Lectinas são descritas atuando na polarização da membrana celular e regulação

de canais iônicos particulares e podem também estar envolvidas em processos de incompatibilidade genética (Carvalho 1990).

A função das proteínas está relacionada com a sua configuração tridimensional e esta configuração, por sua vez, é estabelecida por sua sequência de aminoácidos. Apesar da complexidade das sequências das proteínas, a modelagem computacional por homologia é uma opção viável para a geração de modelos 3D de proteínas com estrutura ainda desconhecida, com base em proteínas homologas com estruturas já determinadas.

Os modelos 3D propostos neste trabalho demonstram diferenças significativas na estrutura das lectinas de *A. sativum* e *A. ursinum* observados na Figura 4. Observa-se a presença de beta-folhas na região do domínio PD585253, no modelo de *A. sativum* que estão ausentes em *A. ursinum*, o que explica a ausência deste domínio conservado nesta espécie. O domínio PD330654, no entanto, apresenta conformação similar, sugerindo que este domínio apresenta a mesma função nas duas espécies.

Segundo o nosso conhecimento, este trabalho apresenta os dois primeiros modelos 3D da lectina manose-específica para o gênero *Allium*. A modelagem 3D e a análise comparativa desta proteína proporcionarão informações valiosas no entendimento de suas evolução e funções moleculares nas espécies desse gênero.

## CONCLUSÕES

As árvores filogenéticas das espécies de *Allium* construídas por meio da sequência da proteína lectina manose-específica não apresentam consistência com proposta de classificação infragenérica apresentada na literatura para este gênero. No entanto os métodos utilizados se mostraram suficientes para a separação até o nível de tribos dentro da família Amaryllidaceae.

O uso de ferramentas *in silico* se mostrou viável para construção de um modelo 3D de proteínas por meio de modelagem por homologia. Os modelos 3D gerados demonstraram estabilidade

quanto ao nível energético, possibilitando a análise de suas estruturas terciárias e funções moleculares.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Jimenez HJ foi financiado por uma bolsa de doutorado CAPES, Moraes Filho RM foi financiado por uma bolsa de pós-doutorado CAPES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade MA, O'Donoghue SI, Rost B. (1998). Adaptation of protein surfaces to subcellular location. **J Mol Biol.** 276 (2): 517-525. [https://doi: 10.1006/jmbi](https://doi.org/10.1006/jmbi).

Andrade LF, Nahum LA, Avelar LGA. (2011). Eukaryotic protein kinases (ePKs) of the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **BMC genomics** 12 (1): 215. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-215>

Barre A, Hervé C, Lescure B, Rougé P. (2002). Lectin receptor kinases in plants. **Plant Science.** 21 (4): 379-399.

Benkeblia N. (2003). Postharvest technology of onions. In: Driss R, Niskanen R, Mohan-Jain S. (Ed.) Crop management and post harvest handling of horticultural products. Enfield: **Science Publishers** 5:107-137.

Carneiro JGM. (1997). Características Funcionais de Concentrados Protéicos de Soro de Leite de Cabras. Campinas. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254345>

Carvalho HF. (1990). Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura** 42: 884-893.

Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr** 66: 12-21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>.

Chen VB, Davis IW, Richardson DC. (2009). KING (Kinemage, Next Generation): a versatile interactive molecular and scientific visualization program. **Protein Sci** 18: 2403-2409. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.250>

Dias RO, Machado LS, Migliolo L, Franco OL. (2015). Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules** 20: 519-541. <https://doi.org/10.3390/molecules20010519>.

Dutta I, Saha P, Majumder P, Sarkar A, Chakraborti D, Banerjee S, Das S. (2005). The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. **Plant Biotechnol J.** 3 (6): 601-611. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00151.

Follmer C, Wassermann GE, Carlini CR. (2004). Separation of Jack (*Canavalia ensiformis*) Urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. **Plant Science** 167: 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.019>

Franz H. (1988). The ricin story. **Adv. Lectin Res** 1: 10–25.

Fritsch RM, Blattner FR, Gurushidze M. (2010). New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. **Phyton** 49: 145–220. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103124428>

Fritsch RM, Astanova SB. (1998). Uniform karyotypes in different sections of *Allium* L. subgenus *Melanocrommyum* (Webb & Berth.) Rouy from Central Asia. Feddes Repertorium – **Journal of Botanical Taxonomy and Geobotany** 109: 539–549.



Friesen N, Klaas M. (1998). Origin of some minor vegetatively propagated *Allium* crops studied with RAPD and GISH. **Genetic Resources and Crop Evolution** **45**: 511–523.

<https://doi.org/10.1023/A:100864770>

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: The proteomics protocols handbook (Walker JM, ed.). 571-607.

<https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>

Ghazarian H, Idoni B, Oppenheimer SBA. (2011). glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem** **113** (3): 236-247. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

[doi:10.1016/j.acthis.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004).

Harris JC, et al. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Bio technology** **57** (3): 282-286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759674>

Hecht M, Bromberg Y, Rost B. (2015). Better prediction of functional effects for sequence variant.

**BMC Genomics** **16**: S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S8-S1>

He XJ. (1999). **Studies on evolutionary biology of the genus *Allium* L. in China**. PhD thesis, Sichuan University, Chengdu.

Herre J, Willment JA, Gordon S, Brown GD. (2004). The role of Dectin-1 in antifungal immunity.

**Crit Rev Immunol** **24**: 193–203. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v24.i3.30>.

Kasap S, Benkrid K. (2010). High performance phylogenetic analysis with maximum parsimony on reconfigurable hardware. *IEEE Transactions on Very Large Scale Integration VLSI Systems* **99**: 1-

13. <https://doi.org/10.1109/TVLSI.2009.2039588>

Khan F, Ahmad A, Khan MI. (2007). Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Arch Biochem Biophys** **457**: 243–251.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.10.019>

Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.** **33** (7): 1870-4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat. Protoc** **10**: 845-858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.

Kiraga J, et al. (2007). The relationships between the isoelectric point and: length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. **BMC Genomics** **8**: 163-170. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-163>

Krieger E, Joo K, Lee J, Raman S, et al. (2009). Improving physical realism, stereochemistry and side-chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. **Proteins** **77**: 114-122. <http://doi:10.1002/prot.22570>.

Kruse J. (1992). Growth form characters and their variation in *Allium* L. In: Hanelt P, Hammer K, Knu"pffer H. eds. The genus *Allium*: taxonomic problems and genetic resources. Proceedings of an international symposium held at Gatersleben. 11-13.

Li QQ, Zhou SD, He XJ, Yu Y, Zhang YC, Wei XQ. (2010). Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. **Annals of Botany** **106** (5): 709-733. <http://doi:10.1093/aob/mcq177>.

Liu B, Li J, F, Ao Y, Qu J, Li Z, Su J, et al. (2012). Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. **Plant Cell** **24** (8): 3406-3019. <http://dx.doi:10.1105/tpc.112.102475>.

Moraes Filho RM, Martins LSS. (2016). In silico comparative analysis of tylenchid nematodes pectate lyases. **Genetics and Molecular Research-GMR** 15038402. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15038402>

Murdock Richard, Larry L, Shade Chem. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **J Agric Food** 50 (22): 6605-6611. <http://dx.doi.org/10.1021/jf020192c>

Nandi S, et al. (2006). Comparison of theoretical proteomes: identification of COGs with conserved and variable pI within the multimodal pI distribution. **BMC Genomics** 6: 116-10. <http://doi:1186/1471-2164-6-116>.

Nelson DL, Cox MM. (2005). Lehninger: Principles of Biochemistry. WH Freeman and Company, New York.

Peumans WJ, Van Damme JM. (1995). Lectins as plants defense proteins. **Plant Physiology** 109: 2347-352.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem** 25 (13): 1605-12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Powell KS, Gatehouse AMR, Hidler VA, Gatehouse JA. (1995). Different antimetabolic effects of related lectins towards nymphal stages of *Nilaparvata lugens*. **Entomol. Exp. Appl** 75: 51-59.

Rahbe Y, Sauvion N, Febvay G, Peumans WJ, Gatehouse AMR. (1995). Toxicity of lectins and Processing of ingested proteins in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Entomol. Exp. Appl.** 76: 143-155.

Rahn K. Alliaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). (1998). The families and genera of flowering plants, Berlin: **Springer** 3: 70-78.

Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. (2004). The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens** 64: 1-12. <https://doi:10.1111/j.0001-2815.2004.00278>.

Servant F, Bru C, Carrère S, Courcelle E, Gouzy J, et al. (2002). ProDom: Automated clustering of homologous domains. **Briefings in Bioinformatics** 3: 246-251.

Sharon N, Lis H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules.

**Glycobiology** 14 (11): 53-62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>

Smeets K, Van Damme E, Peumans WJ. (1997). Developmental regulation of lectin and alliinase synthesis in garlic bulbs and leaves. **Plant Physiol** 113: 765–771.

Southworth D. (1975). Lectins stimulate pollen germination. **Nature** 258: 600-602.

Sousa AS. (2015). **Viabilidade e ação de lectinas na germinação in vitro de grãos de pólen de dendezeiro (*elaeis guineensis* jacq. – arecaceae) feira de Santana**. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Souza VC, Lorenzi H. (2012). **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APGIII. 3.ed. São Paulo: Editora Plantarum. 768.

Troegeler A, Mercier I, Cougoule C. (2017). C-type lectin receptor DCIR modulates immunity to tuberculosis by sustaining type I interferon signaling in dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 114 (4): 540-549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613254114>.

Tsirigos KD, Peters C, Shu N, Käll L. (2015). The TOPCONS web server for combined membrane protein topology and signal peptide prediction. **Nucleic Acids Res** 43: 401-407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv485>.

Van Holle S, De Schutter K, Eggermont L, Tsaneva M, Dang L, Van Damme EJM. (2017). Comparative Study of Lectin Domains in Model Species: New Insights into Evolutionary Dynamics.

Komatsu S, ed. **International Journal of Molecular Sciences**. 18 (6): 1136. <https://doi.org/10.3390/ijms18061136>.

Van damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles.

**Critical Reviews in Plant Sciences** 17: 575-692.

Vandenborre G, Smagghe G, Gesquière B, Menschaert G, Rao RN, Gevaer K, Van Damme EJM. (2011). Diversity in protein glycosylation among insect species. **PLoS ONE** 6 (2): 1-9. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0016682](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016682)

Vasconcelos J, Vieira JGP, Vieira EPP. (2009). Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. **Revista Científica da UFPA** 7 (1): 1-10.

Vojdani F. (1996). Solubility. In: Hall, G.M. Ed., **Methods of Testing Protein Functionality**. St. Edmundsbury Press, London. 11-60.

Watson JD, Laskowski RA, Thornton JM. (2005). Predicting protein function from sequence and structural data. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 15: 275–284.

Wiederstein M, Sippl M J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids** 35: 407-410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

Zhang Z, et al. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. **Nature** 392: 677-84.

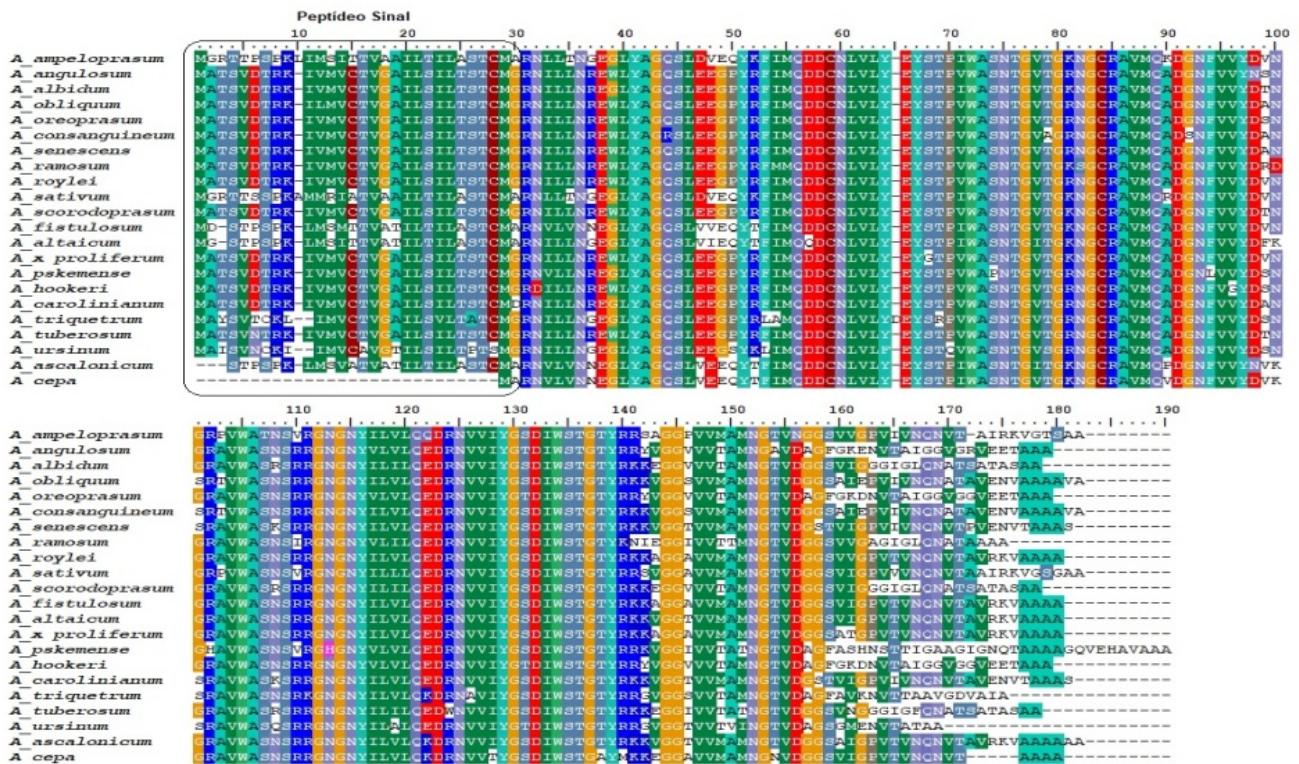
Zhou SD, He XJ, Yu Y, Xu JM. (2007). Karyotype studies on twenty-one populations of eight species in *Allium* section *Rhiziridium*. **Acta Phyto taxonomica Sinica** 45: 207-216.

Zuo Z, Fan H, Wang X, Zhou W, Li L. (2002). Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternate* with antineoplastic activity. **Springer Plus** 1: 1-9. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-13>

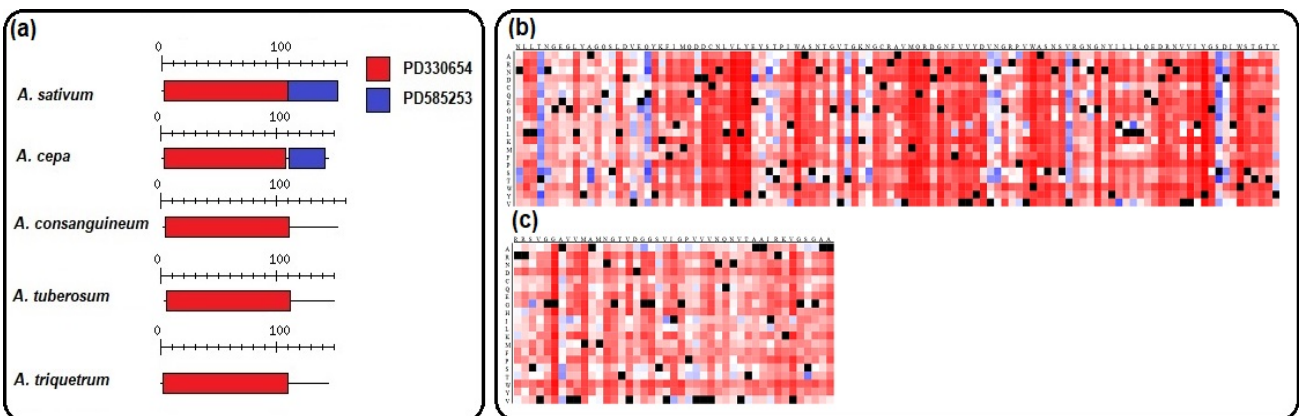
**Tabela1.** Análise da estrutura primária e localização subcelular das seqüências de lectina manose-específica avaliadas.

Espécie	GB-ID	SCPS	Nº aa	PM (kDa)	pI	Gravy	NC
<i>A. ampeloprasum</i>	AAC37361.1	30-31	180/150	19.23/16.16	9.07/8.62	-0.056/-0.136	16
<i>A. angulosum</i>	AMZ79750.1	29-30	177/148	19.17/16.18	6.27/5.43	-0.005/-0.221	8
<i>A. albidum</i>	AMZ79752.1	30-31	176/147	18.75/15.76	7.61/6.44	-0.003/-0.2333	8
<i>A. obliquum</i>	AMZ79761.1	29-30	180/151	19.45/16.45	5.42/5.07	-0.055/-0.154	8
<i>A. oreoprasum</i>	AMZ79751.1	29-30	177/148	19.09/16.10	5.11/4.87	-0.014/-0.210	8
<i>A. consanguineum</i>	AMZ79762.1	29-30	180/151	19.46/16.48	6.25/5.41	-0.063/-0.147	8
<i>A. senescens</i>	AMZ79757.1	29-30	179/150	19.43/16.45	7.61/6.44	-0.041/-0.175	16
<i>A. ramosum</i>	AMZ79755.1	29-30	173/144	18.52/15.54	4.85/4.65	-0.092/-0.122	16
<i>A. roylei</i>	AMZ79763.1	30-31	178/149	19.18/16.20	8.73/8.64	-0.061/-0.153	8
<i>A. sativum</i>	AAB64237.1	30-31	181/151	19.29/16.22	8.84/6.40	-0.065/-0.090	8
<i>A. scorodoprasum</i>	AMZ79756.1	29-30	176/147	18.86/15.88	7.61/6.44	-0.008/-0.238	8
<i>A. fistulosum</i>	BAP75574.1	29-30	177/149	18.88/15.99	7.65/7.94	-0.092/-0.039	8
<i>A. altaicum</i>	ADN26577.1	29-30	177/149	18.94/16.12	9.05/8.96	-0.134/-0.028	8
<i>A. x proliferum</i>	AMZ79754.1	29-30	178/149	19.10/16.12	8.72/8.62	-0.025/-0.195	8
<i>A. pskemense</i>	AMZ79764.1	29-30	188/159	19.80/16.82	6.04/5.73	-0.070/-0.128	8
<i>A. hookeri</i>	AMZ79753.1	29-30	177/148	19.04/16.06	4.92/4.73	-0.012/-0.241	7
<i>A. carolinianum</i>	AMZ79759.1	29-30	179/150	19.33/16.29	6.24/6.44	-0.046/-0.149	16
<i>A. triquetrum</i>	ABA00714.1	29-28	173/145	18.36/15.51	7.56/6.41	-0.104/-0.189	9
<i>A. tuberosum</i>	AMZ79760.1	29-30	176/147	18.94/15.96	7.61/5.36	-0.055/-0.295	16
<i>A. ursinum</i>	AAC49858.1	28-29	166/138	17.67/14.83	5.01/4.79	-0.092/-0.199	7
<i>A. ascalonicum</i> *	AAC37360.1	27-26	177/151	18.83/16.24	9.22/9.17	0.069/-0.108	8
<i>A. cepa</i> *	AIS22686.1	3-2	146/144	15.71/15.51	5.29/5.3	-0.099/-0.126	8

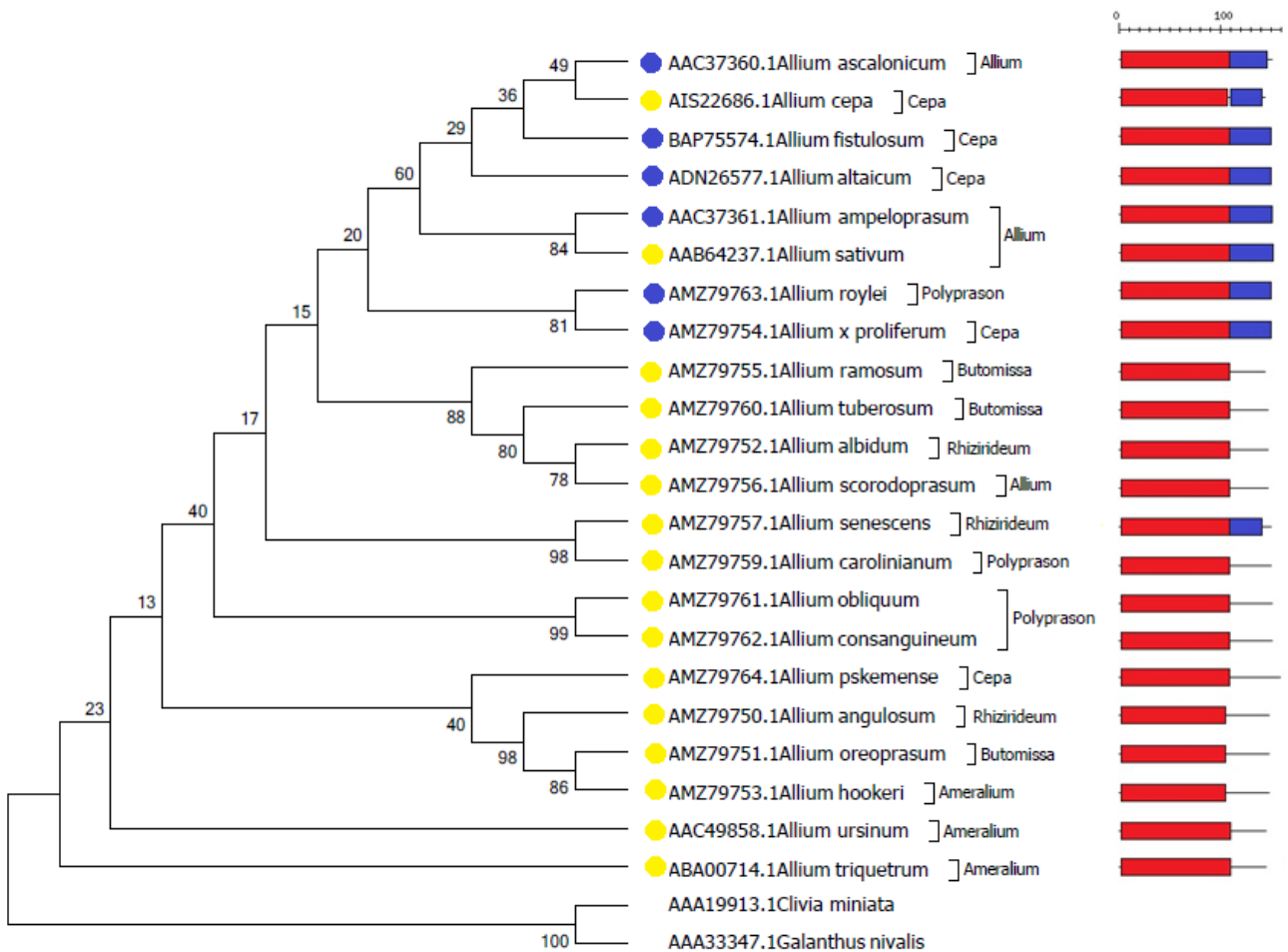
SCPS: Sítio Conservado de Peptídeo Sinal. NC: Número cromossômico (n). GRAVY: Grand Average of Hydropathicity; pI: ponto isoelétrico. \*: Sequência parcial



**Figura 1.** Alinhamento de seqüências de lectina manose-específica avaliadas. As sequências foram alinhadas por ClustalW, onde os resíduos idênticos e similares são exibidos na mesma cor.

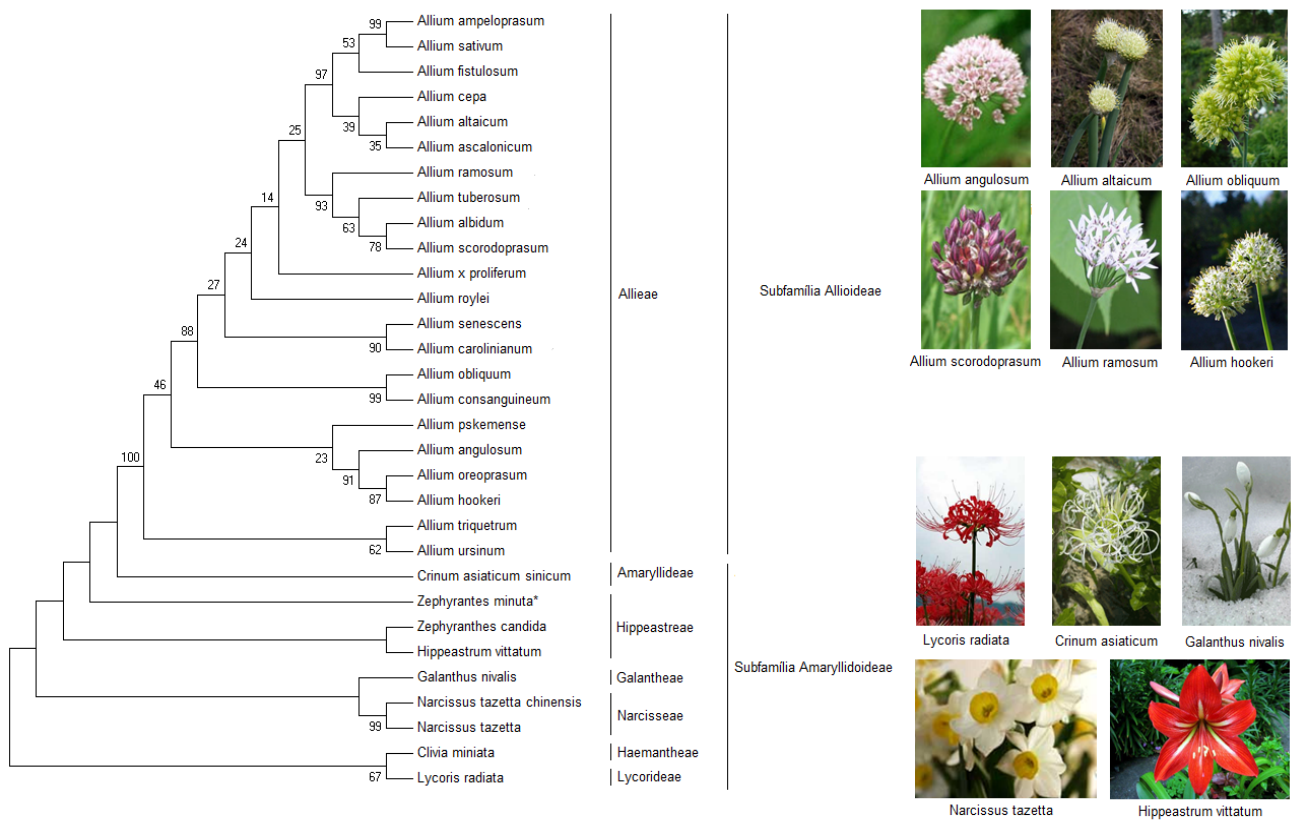


**Figura 2.** Previsão dos efeitos funcionais das mutações em aminoácidos pelo servidor SNAP2 e Domínios funcionais da lectina manose-específica observados pelo servidor ProDom.

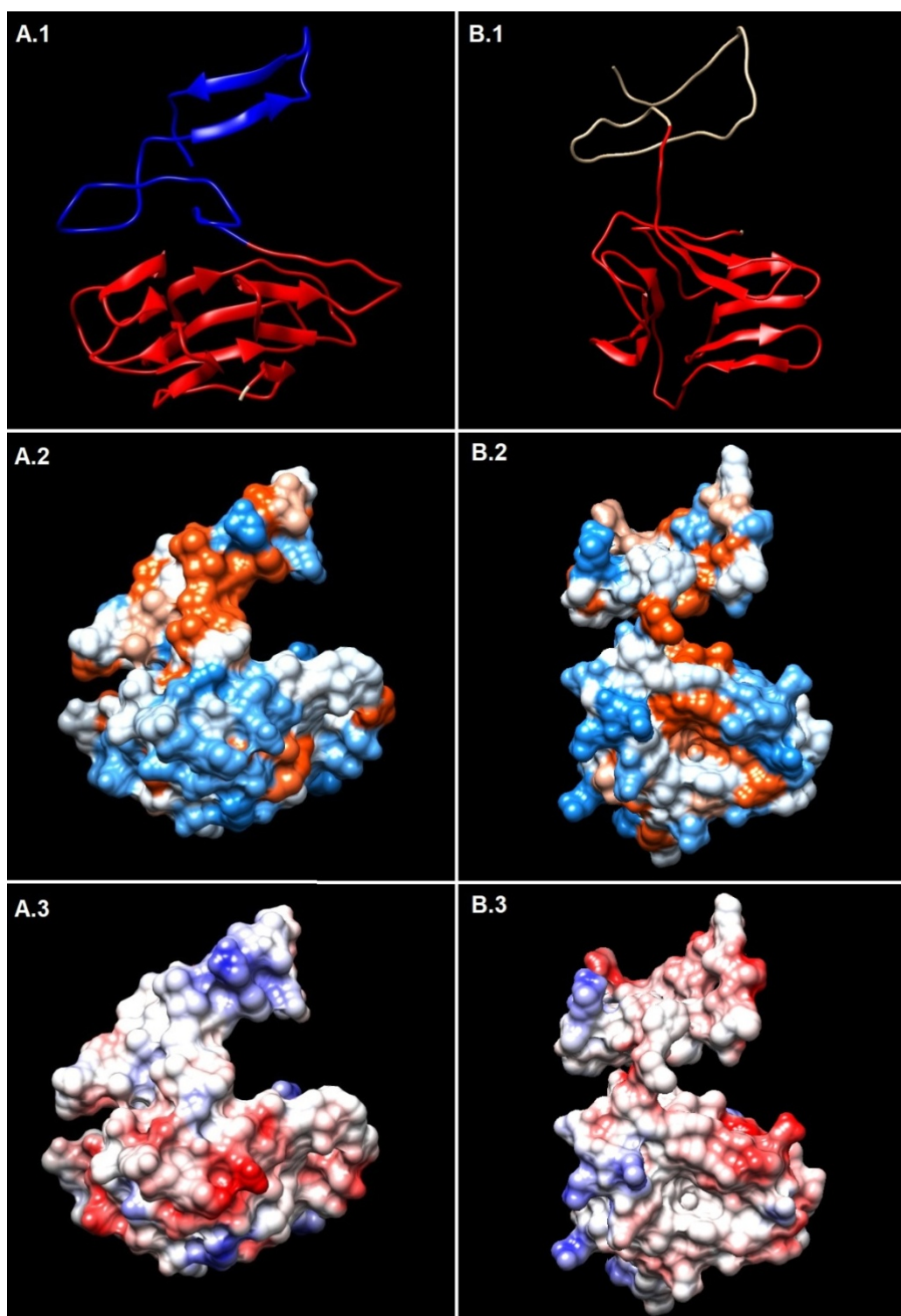


**Figura 3.** Árvore filogenética das espécies de *Allium*, geradas com base nas seqüências de lectinamanoase-específica pelo método máxima parcimônia (MP). Círculos amarelos indicam proteínas ácidas e círculos azuis indicam proteínas alcalinas. As espécies estão representadas por seus respectivos subgêneros. A letra n indica o número cromossômico haplóide das espécies de *Allium*. A figura retangular de coloração vermelha indica o domínio funcional PD330654 e a figura retangular de coloração azul indica o domínio funcional PD585253.

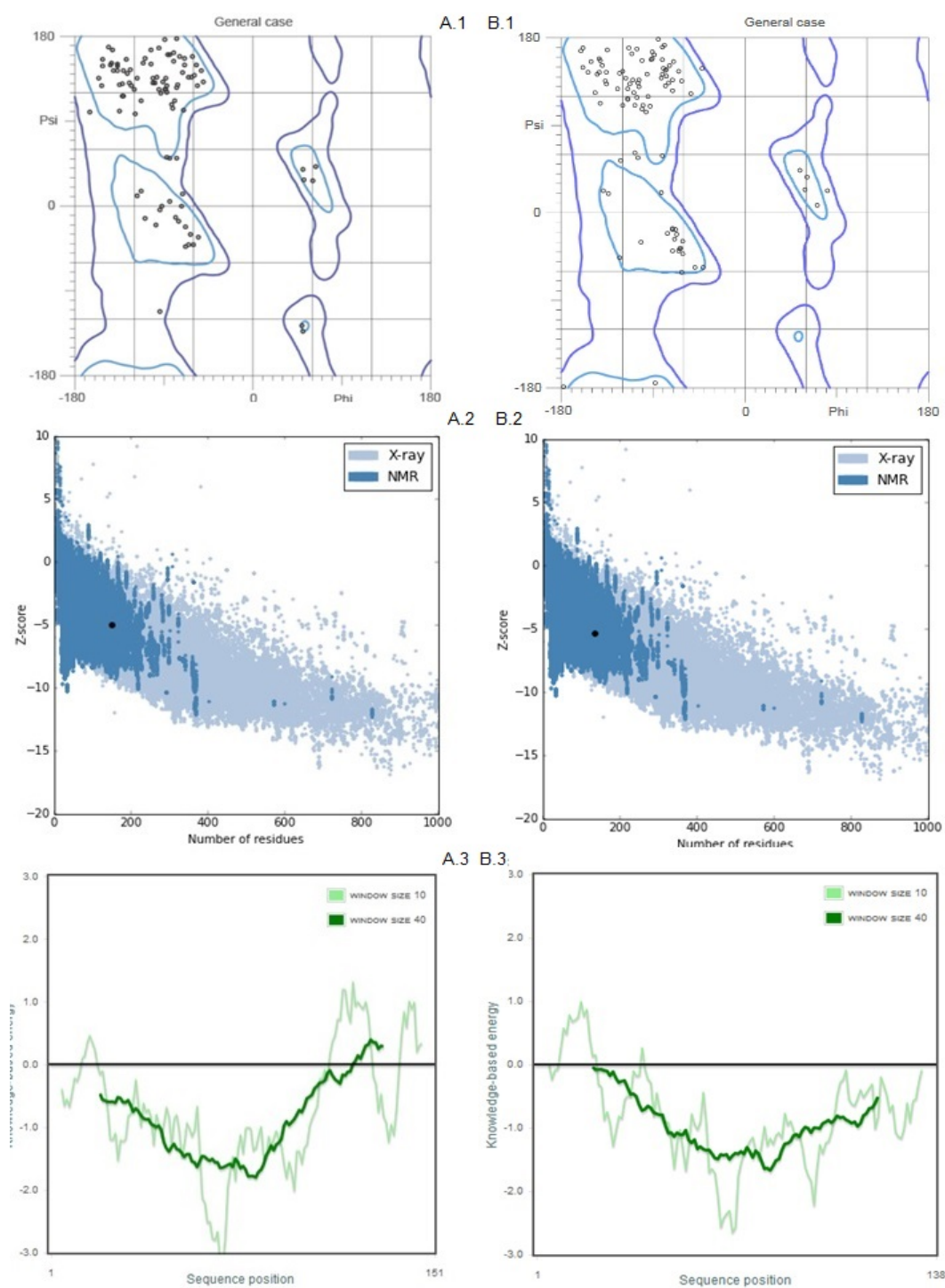




**Figura 4.** Árvore filogenética das espécies da família Amaryllidaceae geradas com base nas seqüências de lectinamanoase-específica pelo método máxima parcimônia (MP). As tribos das subfamílias Allioideae e Amaryllidoideae estão indicadas à esquerda das barras representativas das subfamílias. As espécies inclusas foram: *Crinum asiaticum* var. *sinicum* (GenBank: AAO59507.1), *Zephyranthes minuta* (GenBank: AAN73327.1), *Zephyranthes candida* (GenBank: AAM27447.1), *Hippeastrum vittatum* (GenBank: AAP57409.1), *Galanthus nivalis* (GenBank: AAA33346.1), *Narcissus tazetta* (GenBank: ACR15122.1), *Narcissus tazetta* var. *chinensis* (GenBank: ADN05761.1), *Clivia miniata* (GenBank: AAA19913.1) e *Lycoris radiata* (GenBank: AAP20877.1). Figuras obtidas em <https://pfaf.org/>. \* A espécie *Zephyranthes minuta* está identificada no GenBank com a sinonímia *Amaryllis minuta*.



**Figura 5.** Estrutura tridimensional predita pelo servidor Phyre2 para lectina manose-específica da espécie *A. sativum* (A1) e *A. ursinum*. (A2). Hidrofobicidade representada como gradiente de cor, sendo o azul o mais hidrofílico e vermelho alaranjado para os mais hidrofóbicos da espécie *A. sativum* e (B2) *A. ursinum* (B1). Superfície eletrostática representada como um gradiente de cor, a partir domais carregado negativamente (vermelho) para o mais positivamente carregado (azul) da espécie *A. sativum* (A3) e *A. ursinum*(B3).



**Figura 6.** Gráfico de Ramachandran gerado pelo servidor MolProbity, a partir do modelo tridimensional construído pelo servidor Phyre2 para *A. sativum* (A1). *E. A. ursinum* (B1). Valor do Z-score (ponto preto) pelo ProSA-web para *A. sativum* (A2) e *A. ursinum* (B2). Uso do ProSA-web para lectina manose-específica mostrando o gráfico de energia de descores de resíduos da estrutura de proteína nativa para *A. sativum* (A3) e *A. ursinum* (B3).

**Genômica Comparativa de Plastomas de Espécies da Família Amaryllidaceae**

---

**CAPÍTULO III**

**Artigo a ser submetido à Revista Brazilian Journal of Botany (Qualis B1)**

## Genômica Comparativa de Plastomas de Espécies da Família Amaryllidaceae

Horace José Jimenez<sup>1,2</sup>, Allan Deyws Francisco da Silva<sup>1,2</sup>, Luiza. Suely Semen Martins<sup>1,3</sup>,  
Reginaldo de Carvalho<sup>1,3</sup>, Rômulo Maciel Moraes Filho<sup>1,2</sup>.

### RESUMO

O gênero *Allium* abrange mais de 800 espécies, sinalizando-se entre os maiores entre as monocotiledôneas. O gênero contém muitas espécies economicamente importantes, incluindo alho, alho-poró, cebola, cebolinha e cebolinha chinesa. Devido á alta conservação dos genomas dos cloroplastos em comparação com os genomas nucleares e mitocondriais sequências de genomas de cloroplastos em Amaryllidaceae tem sido constantemente utilizadas para identificação de espécies e vários programas e estratégias *in silico* tem sido utilizados no sentido de identificar, caracterizar e comparar regiões do genoma plastidial. Plastomas de 15 espécies da família Amaryllidaceae revelaram similaridade tanto em sequencias quanto na organização de suas regiões gênicas. Quatro microssatélites gênicos (*rpoC2*, *cemA*, *ycf2* e *ycf2.1*) foram revelados, sendo classificados como perfeitos e imperfeitos. Não foi observado polimorfismo de tamanho em nenhum dos quatro microssatélites gênicos analisados e todos os observados foram do tipo substituição. As árvores filogenéticas adquirida através do alinhamento dos plastomas completos, e do gene plastidial *matK*, revelaram semelhança com a proposta de classificação para a família. Para o gênero *Allium*, Houve a formação de três clados com perfeita correspondência dos agrupamentos às três linhas evolutivas do gênero.

**Palavras-chave:** Filogenia; *Allium*, Amaryllidaceae, *Plastoma*, Microssatélite.

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas; Departamento de Agronomia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Agronomia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil. <sup>3</sup>Departamento de Biologia; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Recife - PE- Brasil. Autor para correspondência e-mail: romulommfilho@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

The genus *Allium* covers more than 800 species, signaling among the largest among monocotyledons. The genus contains many economically important species, including garlic, leeks, onions, chives and chives. Due to the high conservation of chloroplast genomes compared to nuclear genomes and mitochondrial genome, sequence of chloroplasts in Amaryllidaceae have been consistently used for species identification and various *in silico* programs and strategies have been used to identify, characterize and compare regions of the plastid Genome. Plastome of 15 species of the Amaryllidaceae family revealed similarity in both sequences and in the organization of their gene regions. Four genic microsatellites (*rpoC2*, *cemA*, *ycf2* and *ycf2.1*) were revealed, being classified as perfect and imperfect. No size polymorphism was observed in any of the four gene microsatellites analyzed and all of them were of the substitution type. Phylogenetic trees acquired through alignment of complete plastomas and the plastidial *matK* gene revealed similarity to the proposed classification for the family. For the genus *Allium*, there was the formation of three clades with perfect correspondence of the clusters to the three evolutionary lines of the genus.

**Key words:** Phylogeny; *Allium*, Amaryllidaceae, Plastome, Microsatellite.

## INTRODUÇÃO

A família Amaryllidaceae compreende cerca de 80 gêneros com aproximadamente 1600 espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Souza e Lorenzi 2012, Stevens 2014). Dentro da família, *Allium* (subfamília Alliioideae) é um dos maiores gêneros compreendendo mais de 750 espécies (Seregin et al. 2015, Li et al. 2010), que são distribuídas quase exclusivamente no Hemisfério Norte. É amplamente distribuída na natureza, tendo se adaptado a diversos habitats em todas as regiões (Li et al. 2010). Seu principal centro de diversidade está localizado entre o sudoeste e a Ásia Central e a região do Mediterrâneo, que também deve ser o principal centro de diversificação do *Allium*, além de um segundo existente na América do Norte (Choi e Oh 2011). A maioria das

espécies produz quantidades notáveis de sulfóxidos de cisteína, causando o cheiro e sabor específicos de cebola e alho (Friesen et al. 2006).

O gênero *Allium* está atualmente dividido em 15 subgêneros e 72 seções (Friesen et al. 2006). A classificação do gênero tem se mostrado muito difícil, onde muitas ambigüidades permanecem na filogenia de *Allium* (Fritsch e Friesen 2002, Gurushidze et al. 2008). Além disso, existe grande diversidade morfológica no nível intraespecífico em espécies como *Allium cepa*, *A. sativum* e *A. porrum*. Essas variações devem ser medidas no nível molecular para sua caracterização adequada, que em última instância será benéfico para futuros programas de melhoramento (Caixeta et al. 2003). Várias regiões do genoma plastidial (*trnL - trnF*, *matK*, *rbcL* e *rpl16*) têm sido freqüentemente utilizadas para análise filogenética das espécies. Um primeiro estudo para a estruturação do gênero *Allium* por marcadores moleculares foi executado por Linnevon Berg et al. (1996), onde foi possível confirmar a classificação subgenérica baseada na associação de métodos morfológicos e outros, mas verificou-se que os subgêneros *Amerallium* e *Bromatorrhiza* não foram distinguidos. Atualmente estudos moleculares tem se concentrado na classificação e na filogenia de todo o gênero *Allium* (Fritsch e Friesen 2002; Friesen et al. 2006) ou subgêneros exclusivos como *Amerallium* (Li et al. 2010), *Melanocrommyum* (Fritsch et al. 2010) e *Rhizirideum* (Li et al. 2010). Outros autores tem focado nas origens e evolução das principais espécies de *Allium* (Friesen et al. 1999, Li et al. 2010, Li et al. 2016), a filogenia da seção *Cepa* (Mill.) Prock (Gurushidze et al. 2007) e a configuração filogenética das espécies ocidentais norte-americanas (Nguyen et al. 2008).

Os pesquisadores têm buscado usar sequências completas do genoma do cloroplasto para obtenção de informações sobre plantas, incluindo o exame de relações filogenéticas. A análise filogenética, no entanto, necessita de amostragem considerável de táxons (Jansen et al. 2005), e o uso de genomas inteiros para inferir a filogenia foi limitado pela carência de genomas completos seqüenciados (Soltiss et al. 2004, Jansen et al. 2005). Mas com o surgimento de técnicas de clonagem e seqüenciamento relativamente rápidas e mais baratas (Jansen et al. 2005, Barrett et al. 2016), observa-se uma recente onda de genomas plastidiais seqüenciadas. Este rápido crescimento na

disponibilidade de sequências completas de genoma do cloroplasto forneceu uma riqueza de novos dados para análises filogenéticas entre as espécies (Jansen et al. 2005).

Os cloroplastos são organelas essenciais em células vegetais e exercem uma função crucial na manutenção da vida (Xiong et al. 2009). Os genomas de cloroplastos são principalmente herdados do genitor materno (Rogalski et al. 2015). O plastoma possui uma estrutura molecular circular de cadeia dupla; um comprimento de 120-220kb; e 120 a 140 genes codificadores de proteínas (Rogalski et al. 2015). A estrutura quadripartite do genoma do cloroplasto contém uma região de cópia única grande (LSC), uma região de cópia única pequena (SSC) e duas cópias de uma região de repetição invertida (IRA e IRB). Devido á alta conservação dos genomas dos cloroplastos em comparação com os genomas nucleares e mitocondriais, sequências de genomas de cloroplastos tem sido constantemente utilizados para estudos filogenéticos e identificação de espécies (Raubeson e Jansen 2005, Song et al. 2015). Vários programas e estratégias *in silico* tem sido utilizados no sentido de identificar, caracterizar e comparar regiões do genoma plastidial para análises filogenéticas das espécies estudadas (Morton e Telmer 2014, Erguiluz et al. 2017). Juntas estas informações podem auxiliar os programas de melhoramento genético da cultura, seja através de métodos convencionais ou da bioengenharia.

O genoma dos eucariontes e procariontes possuem sequências simples repetidas (*Sequence Simple Repeats*) que permitem ser utilizadas como marcadores de DNA, sendo uma ferramenta útil para análise da distância genética entre indivíduos, para a identificação de cultivares (Caixeta et al. 2013). Esses marcadores são sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (Caixeta et al. 2013). Essas sequências repetitivas são flanqueadas por sequências únicas, geralmente conservadas entre indivíduos da mesma espécie, podendo ser vistas em genomas nucleares, mitocondriais e cloroplastidiais, em exons e íntrons, caracterizando-se por serem altamente polimórficas com relação ao seu tamanho, fazendo com que sejam marcadores ideais para estudos em nível populacional (Zane et al. 2002, Ellegren 2004). As vantagens dos microsatélites são a sua alta qualidade, elevado grau de polimorfismo, exprimem herança mendeliana simples e serem



fundamentados na reação de PCR (Jiménez e Collada 2000). Os microssatélites permitem analisar materiais como fósseis e plantas herborizadas, pois são baseados em sequência de DNA, o que confere uma vantagem adicional (Caixeta et al. 2013). A desvantagem do uso dos microssatélites são as etapas do seu desenvolvimento, já que exige o isolamento, clonagem, seqüenciamento e caracterização destes loci na espécie a ser estudada, além do alto custo do processo (Caixeta et al. 2013). Contudo o seqüenciamento de DNA de diferentes espécies e o uso da bioinformática vem possibilitando a construção de *primers* de microssatélites por um processo menos trabalhoso e de menor custo (Caixeta et al. 2013).

Diante do exposto, sequências de DNA plastidial de 15 espécies pertencentes à família Amaryllidaceae disponíveis em bancos de dados públicos foram analisadas com base em ferramentas *in silico* com os seguintes objetivos: 1) realizar uma análise comparativa entre os genomas plastidiais de espécies da família, com base no levantamento de sequências completas de genoma plastidial no banco de dados do Gen Bank; 2) observar a ocorrência de SSRs em genomas plastidiais; 3) realizar uma reconstrução filogenética, com base em sequências de genoma plastidial para compreender as relações entre as espécies do grupo; 4) realizar análise filogenética com base em um gene plastidial (*matK*) para espécies da família Amaryllidaceae e compreender suas relações a nível de subfamília.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Recuperação e caracterização de sequências de genomas de cloroplasto de espécies da família Amaryllidaceae**

As sequências de genoma de cloroplasto das espécies foram recuperadas do banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information), em formato FASTA, contendo 15 espécies da família Amaryllidaceae.

### **Anotação do genoma e identificação de regiões microssatélites**

Para localização das regiões de microssatélites foram empregadas as seqüências de genoma completo de cloroplasto das quinze espécies de Amaryllidaceae obtidas pelo GenBank. Os microssatélites foram identificados e localizados através servidor Gramene Ssrtool (Temnykh et al. 2001), que identifica repetições de di-, tri-, tetra e pentanucleotídeos. No estudo foram consideradas apenas: dímeros com no mínimo cinco repetições e tri, tetra e pentanucleotídeos com no mínimo quatro repetições. As repetições em regiões gênicas e intergênicas foram identificadas com base nas informações de anotação de seqüências disponíveis no servidor DOGMA (Dual Organellar Genome Annotation) (Wyman et al. 2004). As seqüências dos genes, onde foram localizados os microssatélites foram analisadas através do servidor ORFfinder (Open Reading Frame Finder), para verificar as regiões codificantes (ORFs) e a presença de microssatélites nessas regiões. O alinhamento dos genes abrangendo os microssatélites foi feito através do software MEGA7 versão 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al. 2016) usando o algoritmo de alinhamento múltiplo CLUSTAL W (Thompson et al. 1994).

### **Alinhamento e reconstrução filogenética**

Os plastomas foram alinhados usando o algoritmo mLAGAN fundamentado no servidor mVISTA (Brudno et al. 2003). Os parâmetros padrões foram aplicados, e a estrutura de anotação do genoma do cloroplasto de *A. cepa* foi utilizada como referência. A porcentagem de identidade entre cada plastoma, todas relativas à *A. cepa* foram posteriormente visualizadas através de um gráfico VISTA (Frazer et al. 2004). A filogenia baseada em plastoma foi reconstruída para as quinze espécies de Amaryllidaceae, usando o alinhamento de plastoma total gerado por mLAGAN. Plastoma da espécie *Yucca filamentosa* (Asparagaceae) também foi incluído como grupo externo. Por meio do software MEGA 7.0 foi calculado o número de sítios variáveis, de acordo com a espécie *A. cepa* utilizada como referência.

O alinhamento foi importado para software MEGA7, versão 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar et al. 2016), para a análise filogenética pelo método de Maxima verossimilhança. O modelo de substituição foi o do tipo GTR+G obtido pelo JmodelTEST (Posada 2008). O suporte estatístico foi obtido por meio de bootstrap, usando 1000 replicatas. Os bootstrap de 90-100 foram considerados fortemente suportados, 80-89 moderadamente suportados e 50-79 fracamente suportados. Para a filogenia da família Amaryllidaceae, com base na sequência do gene plastidial *matK*, além das quinze sequências obtidas dos genomas completos, foram utilizadas mais setenta e três sequências, todas pertencentes às famílias Amaryllidaceae e três como grupo externo da família Xanthorrhoeaceae (*Asphodelus aestivus*, *Hemerocallis fulva* e *Hemerocallis dumortieri*).

As sequências foram alinhadas com o uso do algoritmo ClustalW e uma árvore filogenética foi gerada utilizando o software BEAST, usando o método Bayesiano. Na análise, utilizou-se 2 buscas independentes de Markov chains Monte Carlo (MCMC) executando 10.000.000 gerações com amostras retidas a cada 1.000 gerações, com os primeiros 10% das gerações descartadas como burn-in. As análises foram checadas usando o programa Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond 2009). A árvore filogenética final foi sumarizada na forma de uma “Maximum clade credibility tree” usando o TreeAnnotator v.1.6.2 (Drummond e Rambaut 2007). A árvore foi editada usando o FigTree v1.4.2. O modelo de substituição foi o do tipo GTR+G obtido pelo JmodelTEST (Posada 2008).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A tabela 1 apresenta 15 espécies pertencentes à família Amaryllidaceae com suas informações recuperadas do banco de dados da NCBI. Com relação ao conteúdo GC, as espécies apresentaram uma variação entre 36,7% (*A. schoenoprasum* e *A. sativum*) e 37,5% (*A. coddii*) e o espaço gênico variou de 84.760 (*A. paradoxum*) a 94.766 (*A. sativum*). O número de genes que codificam proteínas variou entre 78 (*A. paradoxum*) a 89 (*Allium cepa*).

O número de pares de base (pb) variou de 145.819 (*A. paradoxum*) a 159.125 (*A. ursinum*) e foi semelhante aos encontrados em monocotiledôneas próximas filogeneticamente a Amaryllidaceae

como espécies do gênero *Polygonatum* (153.821 - 155.580 pb) (Floden e Schilling 2018) e *Asparagus officinalis* (156.699 pb) (Sheng et al. 2017), ambos da família Asparagaceae e *Iris gatesii* (153.441) (Wilson 2014) da família Iridaceae. Os genomas plastidiais revelaram valores de conteúdo GC% (Tabela 1) muito próximas a outros representantes de monocotiledôneas, como no trabalho de Sheng et al. (2017) com *Asparagus officinalis* (GC= 37.76%) e Wilson (2014) com *Iris gatesii* (GC=39.7%). O número de genes que codificam proteínas foi próximo ao encontrado por Floden e Schilling (2018) em Polygonateae, onde foi observado 128 genes com 75 genes codificadores de proteínas, 4 genes rRna e 31 genes tRNA e por Sheng et al. (2017) com *A.officinalis*, onde o autor observou um total de 136 genes previstos no genoma incluindo 78 genes codificadores de proteínas, 30 genes tRNA e 4 genes rRNA.

Plastomas das 15 espécies foram analisados quanto à presença de regiões de microssatélites. Observou-se 383 regiões de SSRs das quais 69 se localizaram em regiões gênicas. A análise revelou os dinucleotídeos como o tipo de repetição mais frequente tanto na região gênica como na intergênica com valores absolutos de 60 e 147 e frequências variando entre 25% a 44,4% e 55,6% a 77% respectivamente (Tabela 2).

A repetição de trinucleotídeos exibiu 1 microssatelite em regiões gênicas e 2 em regiões intergênicas. Os tetranucleotídeos apresentaram 7 microssatélites em regiões gênicas e 132 em regiões intergênicas. Os pentanucleotídeos mostrou 1 microssatelite em regiões gênicas e 33 em regiões intergênicas. A maioria das sequências repetidas e SSRs ficaram presentes nas regiões não codificadoras do genoma, e estas regiões mostram-se mais variáveis que as regiões codificantes e exercem uma função relevante nos estudos filogenéticos em angiospermas (Dong et al. 2012). Esses resultados diferem de alguns trabalhos com outras monocotiledôneas como em *A. officinalis* (Sheng et al. 2017) e *Maianthemum bicolor* (Park et al. 2016), onde foi concluído que os locos SSR são compostos principalmente por baixos números de repetições com predomínio de mononucleotídeos.

Com base nas sequências de microssatélites das espécies foi possível verificar a existência de quatro microssatélites gênicos (*rpoC2*, *cemA*, *ycf2* e *ycf2.1*) (Tabela 3; Figura 2). Os microssatélites

quanto ao tipo foram classificados como perfeitos (sequências com motivos ininterruptos), e imperfeitos, sequências com motivos interrompidos. Não foi observado polimorfismo de tamanho em nenhum dos quatro microssatélites gênicos analisados. O microssatélite encontrado no gene *ycf2* apresentou a forma perfeita para todas as espécies estudadas. Todos os polimorfismos observados foram do tipo substituição. Os microssatélites encontrados nos genes *rpoC2*, *cemA* e *ycf2.1* apresentaram a forma perfeita para a maioria das espécies, onde é possível observar que a espécie *A. prattii* se apresenta de forma imperfeita para os genes *rpoC2* e *ycf2.1*. No gene *rpoC2*, a forma imperfeita de *A. prattii* ocorreu devido a uma mutação de transversão de uma Adenina (A) por uma citosina (C) e timina (T) por guanina (G) e mutação de transição de uma timina (T) para uma citosina (C) e adenina por uma guanina (G). No gene *cemA* a forma imperfeita de *A. coddii* ocorreu devido a uma mutação de transição de uma timina (T) para uma citosina (C). O gene *ycf2.1* apresentou forma imperfeita para *A. prattii* e *A. fistulosum* devido a uma mutação de transversão de uma timina (T) por adenina (A) e citosina (C) por guanina (G) e uma mutação de transição de citosina (C) por timina (T).

Conforme o gráfico VISTA (Figura 1), um elevado nível de conservação foi constatado pela comparação do genoma plastidial das espécies. O número de sítios variáveis, em relação a *A. cepa* variou de 451 a 8690. Como visualizado na figura 2, as regiões em azul são as áreas codificantes e as regiões rosa mostram as áreas não codificantes preservados de acordo com o registro da espécie *A. cepa*, obtida através do servidor DOGMA. A espécie *Y. filamentosa* foi empregada como grupo externo e apresentou divergência em comparação com as outras espécies apresentadas. A semelhança da organização dos plastomas das 15 espécies da família Amaryllidaceae é visível pelo gráfico mVISTA. É possível observar também a ocorrência de uma inversão no plastoma da espécie *A. paradoxum* na região entre os genes *ndhF* e *ndhL*.

Foi observado no alinhamento dos genes com os microssatélites, regiões com elevada similaridade (Figura 2). A variação do tipo substituição foi a que prevaleceu dentre os microssatélites, bem como polimorfismos de sequências. Esses resultados foram também verificados em espécies de gramíneas (Wuet al. 2017) com a ocorrência da variação do tipo substituição entre as espécies.

Numerosas variações microestruturais (como pequenas inserções e deleções e variação de SSR) foram encontradas e constituem um recurso valioso em análises filogenéticas e populacionais (Diekmann et al. 2012).

Os microssatélites são largamente utilizados como marcadores genéticos, disponibilizando informações importantes sobre genética de populações de plantas, estudos ecológicos e evolutivos e investigações filogenéticas por causa da sua natureza não recombinante, haplóide e herdada unitariamente (Xue et al. 2012). Wheeler et al. (2014) em uma revisão da utilidade e advertência da utilização de microssatélites de cloroplastos para estudos de biologia vegetal alerta que os marcadores têm sido utilizados para estudos de estrutura genética populacional em espécies nativas e na caracterização da diversidade e origens de espécies cultivadas, onde conclui que locos polimórficos serão mais facilmente obtidos por meio de primers desenvolvidos de espécies intimamente relacionados, acreditando assim que primers universais publicados serão substituídos por primers específicos para espécies. A grande quantidade de sequências de genoma do cloroplasto deve simplificar o projeto de primers para muitos taxons.

Genomas completos de cloroplasto de Amaryllidaceae acessível oferecem uma oportunidade para comparar a variação de sequência dentro da família no nível do genoma (NCBI 2018). O genoma de *A. cepa* exibiu grande similaridade em relação às outras espécies da família Amaryllidaceae, indicando que os genomas do cloroplasto da família são bastante conservados, embora algumas regiões divergentes sejam encontradas entre esses genomas. Os pontos de divergência aconteceram em sua maioria em regiões não codificantes. Estes resultados foram muito semelhantes aos encontrados por Nie et al. (2012), onde foi confirmado que a localização dos pontos de divergências ocorre em sua maioria em regiões intergênicas. Tem sido demonstrado que as regiões não codificadoras de cloroplasto funcionam bem para estudos filogenéticos em angiospermas (Wu et al. 2010) e que essas regiões estejam associadas a sequências repetitivas (Yang et al. 2013). É possível que sequências repetidas também se correlacionem com o rearranjo genômico em genomas de Amaryllidaceae.

A filogenia de espécies da família Amaryllidaceae por meio do genoma completo mostrou uma árvore monofilética e bem suportada com prevalência de um suporte robusto de bootstrap de 100% (Figura 3). Para o gênero *Allium*, Houve a formação de três cladogramas com perfeita correspondência dos agrupamentos às três linhas evolutivas do gênero descritas por (Li et al. 2010) onde o primeiro clado abrangiu o subgênero Amerallium (*A. ursinum* e *A. paradoxum*) (Primeira linha evolutiva). O segundo clado (BS=100%) englobou os subgêneros Anguinum (*A. pratti* e *A. victorialis*) e Melanocrommyum (*A. macleani*) (Segunda linha evolutiva). O terceiro clado foi o maior (BS=100%) e abrangiu os subgêneros Cepa (*A. cepa*, *A. fistulosum* e *A. schoenoprasum*), Polyprason (*A. obliquum* e *A. platyspathum*), Rhizidireum (*A. nutans*) e Allium (*A. sativum*) (Terceira linha evolutiva). A espécie *A. coddi* formou um clado separado junto à espécie do grupo externo *Y. filamentosa* demonstrando ter maior similaridade com esta, em relação ao gênero *Allium* (Figura 3).

A filogenia da família Amaryllidaceae por meio da sequência do gene plastidial *matK*, revelou uma árvore filogenética com a separação das três subfamílias Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae. A subfamília Agapanthoideae com 3 espécies representadas com apenas 1 gênero *Agapanthus* apresentou um alto suporte (PP=100%). A subfamília Allioideae englobou 22 espécies distribuídas entre as tribos Gilliesiaceae, Allieae (PP=100%). A tribo Gilliesiaceae representada pelos gêneros *Leucocoryne*, *Nothoscordum* e *Tristagma* com 7 espécies (PP=100%) e a tribo Allieae com apenas 1 gênero *Allium* (PP=100%). A subfamília Amaryllidoideae com 56 espécies distribuídas entre 13 tribos (PP=100%). A tribo Amaryllideae com os gêneros *Nerine*, *Cybistetes*, *Crinum*, *Boophone* e *Amaryllis* (PP=100%). A tribo Haemantheae com os gêneros *Haemanthus*, *Scadoxus*, *Gethyllis*, *Apodolirion* e *Clivia* (PP=100%). A tribo Calostemmateae com apenas 1 gênero *Calostemma* (PP=100%). A tribo Hippeastreae com os gêneros *Hippeastrum*, *Habranthus* e *Zephyranthes* (PP=100%). A tribo Eustephieae com os gêneros *Chlidanthus* e *Eustephia* (PP=100%). A tribo Narcisseae com o gênero *Narcissus* (PP=60%). A tribo Galantheae com os gêneros *Acis*, *Galanthus* e *Hannonia* (PP=100%).

A filogenia fundamentada com base no genoma do cloroplasto para as espécies do gênero *Allium* mostrou monofiletismo com relações bem resolvidas entre suas espécies e completamente separadas do grupo externo (BS=100%). Indícios prévios de três principais linhas evolutivas na evolução do *Allium* relatadas em Friesen et al. (2006) e Li et al. (2010) tem sido amplamente corroborada em nosso trabalho, com a formação de três clados em *Allium* com a presença de monofiletismo e relações bem suportadas (Figura 3). Espécies do subgênero *Amerallium* (*A. ursinum* e *A. paradoxum*) fazem parte da primeira linha evolucionária do gênero. *Amerallium* é o maior subgênero na primeira linha evolutiva e é extremamente diversificado morfológica e ecologicamente. O subgênero abrange três grupos geográficos únicos: um consistindo de espécies de *Allium* da América do Norte (Novo Mundo) e o restante compreendendo dois grupos menores da região do Mediterrâneo e leste da Ásia (Velho mundo) (Li et al. 2010).

As espécies representantes dos subgêneros *Anguinum* (*A. pratti* e *A. victorialis*) e *Melanocrommyum* (*A. macleani*) fazem parte da segunda linha evolucionária do gênero. *Anguinum* tem uma área de ocorrência em altas montanhas do sudoeste da Europa ao leste da Ásia e no nordeste da América do Norte (Fritsch e Friesen 2002). O subgênero possui caracteres anatômicos radiculares específicos (Frisch 1992), organização de folhas e bulbos (Pastor e Valdes 1985) e reduzido período vegetativo com adequação ao regime de luz (Pistrick 1992). *Melanocrommyum* tem distribuição próxima ao Mediterrâneo e Médio Oriente, alcançando o noroeste da China e Paquistão a leste, e o sul da Sibéria no Norte, sendo a Ásia Central o importante centro de evolução (Khassanov e Frisch 1994; Mes et al. 1999). O subgênero caracteriza-se por apresentar bainhas foliares bem avançadas e exclusiva a partes subterrâneas, com o tempo de desenvolvimento muito reduzido e por possuir várias propriedades anatômicas (Frisch 1992).

As espécies representantes dos subgêneros *Cepa* (*A. cepa*, *A. fistulosum* e *A. schoenoprasum*), *Polyprason* (*A. obliquum* e *A. platyspathum*), *Rhizidireum* (*A. nutans*) e *Allium* (*A. sativum*), fazem parte da terceira linha evolutiva do gênero. Representantes de *Rhizidireum* apresentam diversidade no sul da Sibéria e Mongólia (Frisch 1992). Espécies dos subgêneros *Allium*, *Cepa* e *Polyprason*



abrangem o maior clado na terceira linha evolutiva, onde alguns estudos indica que esses subgêneros não são monofiléticos, com a posição sistemática de algumas espécies tendo que ser revista (Li et al. 2010).

A filogenia com base no marcador *matK* para as espécies da família Amaryllidaceae revelou relações bem resolvidas entre suas espécies e completamente separado do grupo externo (BP=100%). Houve a separação das três subfamílias Agapanthoideae, Allioideae e Amaryllidoideae. Por meio do gene *matK* para a filogenia da subfamília Amaryllidoideae, foi possível resolver a tribo Calostemmateae e Haemantheae como irmãs (PP=100%), no entanto não foi possível resolver a relação das tribos Calostemmateae e Haemantheae com a tribo Cyrthantheae. Meerow et al. (2006) e Ronsted et al. (2012) trabalhando com filogenia em Amaryllidaceae encontraram resultados muito parecidos com marcadores ITS e *ndhF*. Os autores resolveram a tribo Calostemmateae e Haemantheae como irmãs e tribo Cyrthantheae como irmãs destas. No entanto em termos de morfologia pode haver algum questionamento para essa relação. A cápsula indeiscente de Calostemmateae tem mais proximidade com o fruto indeiscente de Haemantheae do que com a cápsula deiscente de *Cyrtanthus* (Ronsted et al. 2012).

A tribo Amaryllideae (PP=100%) foi resolvida como irmã do restante das Amaryllidoideae (PP=100%), concordando com os resultados apresentados por Ronsted et al. (2012), onde o autor obteve um alto suporte Bayesiano (PP=100%) e Bootstrap (BS=100%) para resolver a tribo africana Amaryllideae como irmã das Amaryllidoideae. O clado abrangendo a tribo Hippeastreae com os gêneros *Hippeastrum*, *Habranthus* e *Zephyranthes*, Eustephieae com os gêneros *Chlidanthus* e *Eustephia*, Hymenocallideae com os gêneros *Hymenocallis*, Lycoridae com o gênero *Lycoris*, Clinantheae com o gênero *Clinanthus* e Stenomessae com o gênero *Stenomesson* apresentou um suporte muito baixo (PP=49%). Esses resultados diferiram dos apresentados por (Ronsted et al. 2012), onde o autor resolveu o clado com as tribos Hippeastreae, Eustephieae, Hymenocallideae, Lycoridae, Clinantheae e Stenomessae como um clado americano, com um alto suporte Bayesiano (PP=99%) e fraco Bootstrap (BS=66%).

## CONCLUSÕES

As árvores filogenéticas das espécies da família Amaryllidaceae mostraram semelhança com a proposta de classificação para a família. Esta recomendação é fundamentada tanto pela filogenia baseada no alinhamento completo de plastomas, quanto pela filogenia baseada no gene matK.

Os genomas de cloroplasto de espécies da família Amaryllidaceae são muito conservados, pois o genoma de *A. cepa* revelou similaridade em comparação as outras espécies da família.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado com recursos gerados por bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Allan D. F. da Silva e Horace J. Jimenez como bolsistas de doutorado CAPES, e Rômulo M. Moraes Filho bolsista de pós-doutorado CAPES/UFRPE.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrett CF, Bacon CD, Antonelli A, Ácano T (2016) An introduction to plant phylogenomics with a focus on palms. **Botanical Journal of the Linnean Society** **182**: 234-255. <https://doi.org/10.1111/boj.12399>.
- Brudno M, Cooper GM, Kim MF, Davydov E (2003) LAGAN and Multi LAGAN: efficient tools for large-scale multiple alignment of genomic DNA. **Genome Res** **13**: 721-731. DOI: 10.1101/gr.926603.
- Caixeta ET, Ferrão LFV, Maciel-Zambolim E (2013) Marcadores Moleculares. In: Borém A. Fritschr-Neto R. **Biotechnologia Aplicada ao Melhoramento de Plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema. p.31-68.
- Caixeta RP, Carvalho DD, Rosado SCDS, Trugilho PF (2003) Variações genéticas em populações de *Eucalyptus* spp. detectadas por meio de marcadores moleculares. **Revista Árvore** **27**: 357-363.
- Choi HJ, Oh BU (2011) A partial revision of *Allium* (Amaryllidaceae) in Korea and north-eastern China. **Botanical Journal of the Linnean Society** **167**: 153-211.

- Diekmann K, Hodkinson TR, Barth S (2012) New chloroplast microsatellite markers suitable for assessing genetic diversity of *Lolium perenne* and other related grass species. **Ann Bot** **110**: 1327-1339. pmid:22419761.
- Dong W, Liu J, Yu J, Wang L, Zhou S (2012) Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic level and for DNA barcoding. **PLoS ONE** **7**: 35071. doi:10.1371/journal.pone.0035071.
- Drummond A, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evolutionary Biology** **7**: 214.
- Eguiluz M, Rodrigues NF, Guzman F, Yuyama P, Margis R (2017) The chloroplast genome sequence from *Eugenia uniflora*, a Myrtaceae from Neotropics. **Plant Syst Evol** **303**: 1199-1212. DOI: 10.1007/s00606-017-1431-x.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics** **5**: 435-445.
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I (2004) VISTA: computational tools for comparative genomics. **Nucleic Acids Res** **32**: 273-279.
- Friesen N, Fritsch RM, Blattner FR (2006) Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **Aliso** **22**: 372-395.
- Friesen N, Pollner S, Bachmann K, Blattner FR (1999) RAPD and non coding chloroplast DNA reveal a single origin of the cultivated *Allium fistulosum* from *A. altaicum* (Alliaceae) **American Journal of Botany** **86**: 554-562.
- Fritsch RM, Friesen N (2002) Evolution, domestication and taxonomy. In: Rabino witch HD, Currah L, editors. **Allium crop science: recent advances**. Wallingford, UK: CABI Publishing; pp. 5-30.
- Fritsch RM, Blattner FR (2010) Gurushidze M. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. **Phyton** **49**: 145-220.
- Floden A, Schilling EE (2018) Using phylogenomic data to construct phylogenetic relationships within tribe Polygonateae (Asparagaceae), with a special focus on Polygonatum. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **129**: 202-213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.08.017>.

Fritsch RM, Hanelt P, Martelo K, Knüpffer H (1992) Septal nectars in the genus *Allium* L. 1992. Alemanha Institut für Pflanzen genetik und Kultur pflan zenfor schung. **Gatersleben**. 77-85.

Friesen THM, Fritsch N, Klaas RM, Bachmann M (1997) Criteria for sampling in *Allium* based on the DNA of the chloroplast PCR-RFLPs. **Systematic Botany** **22**: 701-712. DOI: 10.3417/2010034.

Gurushidze M, Fritsch RM, Blattner FR (2008) Phylogenetic analysis of *Allium* subgen. *Melanocrommyum* infers cryptic species and demands a new sectional classification. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **49**: 997-1007.

Gurushidze M, Mashayekhi S, Blattner FR, Friesen N, Fritsch RM (2007) Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis. **Plant Systematics and Evolution** **269**: 259–269.

Khassanov FO, Fritsch RM (1994) Novos taxa em *Allium* L. subgen. *Melanocrommyum* (Webb&Berth.) Central da Rouy da Ásia. **Linzer Biologische Beiträge** **26**: 965-990.

Jansen RK, Cai Z, Raubeson LA, Daniell H, Depamphilis CW, Leebens-Mack J (2007) The analysis of 81 genes from 64 plastid genomes solves relations in angiosperms and identifies evolutionary patterns at the genomic scale. **Proc. Natl. Acad. Sci. EUA** **104**: 19369-19374. doi: 10.1073/pnas.0709121104.

Jansen RK, Raubeson LA, Boore JL (2005) Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences. **Methods Enzymol** **395**: 348-384.

Jiménez P, Collada C (2000) Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. **Invest. Agr. Sist. Recur** **9**: 237-248.

Meerow A, Francisco-Ortega J, Kuhn D, Schnell R (2006) Phylogenetic Relationships and Biogeography within the Eurasian Clade of Amaryllidaceae Based on Plastid *ndhF* and nrDNA ITS Sequences: Lineage Sorting in a Reticulate Area? **Systematic Botany** **31** (1): 42-60.

Morton CM e Telmer C (2014) New subfamily classification for Rutaceae. **Ann Missouri Bot** **99**: 620-641.

Mes THM, Fritsch RM, Pollner S, Bachmann K (1999) Evolution of the chloroplast genome and polymorphic STI regions in the subgenus *Allium Melanchrome*. **Genoma** **42**: 237-247.

Nguyen NH, Driscoll HE, Specht CD (2008) A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **47**: 1157-1172.

NCBI (2018) National Center for Biotechnology Information; **Centro Nacional para Informação Biotecnológica**. Acesso em:4 jun 2018.

Li QQ, Zhou SD, He XJ, Yu Y, Zhang YC, Wei XQ (2010) Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: *Allieae*) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. **Annals of botany** **106** (5): 709-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958792/>.

Li MJ, Tan JB, Xie DF, Huang DQ, Gao YD, He XJ (2016) Revisiting the evolutionary events in *Allium* subgenus *Cyathophora* (Amaryllidaceae): insights into the effect of the Hengduan Mountains Region (HMR) uplift and Quaternary climatic fluctuations to the environmental changes in the Qinghai-Tibet Plateau. **Mol Phylogenet Evol** **94**: 802-813.

Linne von Berg G, Samoylov A, Klaas M, Hanelt P (1996) Chloroplast DNA restriction analysis and the infrageneric grouping of *Allium* (Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution** **200**: 253–261.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution** **33**: 1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054.

Nie X, Lv S, Zhang Y, Du X, Wang L, Biradar SS, Tan X, Weining S (2012) Complete chloroplast genome sequence of a major invasive species, crofton weed (*Ageratina adenophora*). **PLoS ONE** **7**: 5.

Park H, Kim C, Lee Y, Kim M (2016) Development of chloroplast microsatellite markers for the endangered *Maianthemum bicolor* (*Asparagaceae* L.). **Applications in plant sciences** **4**: 8. doi:10.3732/apps.1600032.

Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253-1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>.

Pastor J e Valdes B (1985) Estrutura de algumas espécies de *Allium* (Liliaceae) da Península Ibérica. **Annales Musei Goulandris** **7**: 249-261.

Pistrick K, Hanelt P, Martelo K, Knüpffer H (1992) Phenological variability in the genus *Allium* L. Alemanha. Institut für Pflanz engenetik und Kultur pflan zen forschung. **Gatersleben**. 243-249.

Rambaut A e Drumond A (2009) **Tracer v. 1.5**. disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rogalski M, Vieira LN, Fraga HPF, Guerra MP (2015) Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics. Evolution And biotechnology. **Front Plant Sci 6**: 586. doi:10.3389/fpls.2015.00586.

Rønsted N e Matthew R (2012) Can phylogeny predict chemical diversity and potential medicinal activity of plants? A case study of amaryllidaceae 12: 1. <https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-12-182>.

Sheng W. et al (2017) Complete chloroplast Genome sequence of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) And its phylogenetic position within asparagales. **Journal of Plant Breeding and Genetics 5**: 121-128.

Seregin A (2015) *Allium marmoratum* (Amaryllidaceae), a new species of section *Falcatifolia* from Chimgan Massif, Eastern Uzbekistan. **Phytotaxa 205**. 211-214. 10.11646/phytotaxa.205.3.9.

Song Y, Dong W, Liu B, Xu C, Yao X, Gao J, Corlett RT (2015) Comparative analysis of complete chloroplast genome sequences of two tropical trees *Machilus yunnanensis* and *Machilus balansae* of the family Lauraceae. **Fronteiras na ciência das plantas 6**: 662. doi: 10.3389 / fpls.2015.00662.

Souza VC e Lorenzi H (2012) **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3ª ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa. São Paulo. 768p.

Stevens PF (2014) **Angiosperm Phylogeny Website**. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>.

Soltis DE, Albert VA, Savolainen V, Hilu K, Chase MW, Farris JS, Stefanović S, Rice DW, Palmer JD, Soltis PS (2004) Genome-scale data, angiosperm relationships, and 'ending incongruence': a cautionary tale in phylogenetics. **Trends Plant Sci 9**: 477-483. 10.1016/j.tplants.2004.08.008.

Tambarussi EV, et al. (2009) *In silico* analysis of simple sequence repeats from chloroplast genomes of Solanaceae species. **CropBreed. Appl. Biotech 9**: 344-352.

Temnykh S, Declerck G, Lukashova A. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential, **Genome Res** **11**: 1441-1452. DOI: 10.1101/gr.184001.

Yang JB, Tang M, Li HT, Zhang R, Li DZ (2013) Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. **BMC Evol. Bio** **13**: 1 10.1186/1471-2148-13.

Zane L e Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology. Oxford** **11** (1):1-16.

Wheeler GL, Dorman HE, Buchanan A, Hallagundla L, Wallace LE (2014) A review of the prevalence, utility, and cave at so fusing chloroplast simple sequence repeats for studies of plant biology. **Applications in Plant Sciences** **2**: 1400059.

Wyman SK, Jansen RK, Boore JL (2004) **Bioinformatics** **20**: 3252-3255.

Wilson CA (2014) The Complete Plastid Genome Sequence of *Iris gatesii* (Section *Oncocyclus*), a Bearded Species from Southeastern Turkey. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany** **32**: 1.

Wu FH, Chan MT, Liao DC, Hsu CT, Lee YW, Daniell H, Duvall M (2010) Complete chloroplast genome of *Oncidium Gower Ramsey* and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidiinae*. **BMC plant biology** **10**: 68. doi:10.1186/1471-2229-10-68.

Wu Z, Gu C, Tembrock LR, Zhang D, Ge S (2017) Characterization of the whole chloroplast genome of *Chikusichloamutica* and its comparison with other rice tribe (*Oryzaceae*) species. **PLoS ONE** **12**: e 0177553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177553>.

Xiong AS, Peng RH, Zhuang J, Gao F, Zhu B (2009) Gene duplication, transfer, and evolution in the chloroplast genome. **Biotechnol Adv** **27**: 340–347.

Xue J, Wang S, Zhou SL (2012) Polymorphic chloroplast microsatellite loci in *Nelumbo* (*Nelumbonaceae*). **Am. J. Bot.** **99**: 240–244. 10.3732/ajb.1100547.

**Tabela 1.** Espécies da família Amarilidaceae, com suas respectivas características obtidas através do banco de dados do NCBI.

Espécie	Ref.seq	PB	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Genes	Espaço gênico
<i>Agapanthus coddii</i>	NC_035971	157055	37,5	87	8	38	133	94443
<i>Allium obliquum</i>	NC_037199	152387	36,8	89	8	38	135	94575
<i>Allium sativum</i>	NC_031829	153131	36,7	89	8	38	135	94766
<i>Allium prattii</i>	NC_037432	154482	37	85	8	38	131	94446
<i>Allium victorialis</i>	NC_037240	154074	37	86	8	38	132	94407
<i>Allium cepa</i>	KM088013	153529	36,8	89	8	38	135	94536
<i>Allium macleanii</i>	LT699703	152633	36,9	84	8	37	129	94212
<i>Allium fistulosum</i>	LT674586	152862	36,9	83	8	39	130	94755
<i>Allium schoenoprasum</i>	LT699700	152806	36,7	81	8	39	128	94536
<i>Allium nutans</i>	LT799837	153456	36,9	83	8	39	130	94518
<i>Allium cepa</i> (N)	NC024813	153538	36,8	83	8	39	130	94542
<i>Allium cepa</i> (S)	KF728079	153355	36,8	83	8	39	130	94611
<i>Allium ursinum</i>	MH157875	159125	37,3	85	8	37	130	93410
<i>Allium paradoxum</i>	LT622239	145819	37,2	78	8	38	124	84760
<i>Allium platyspatum</i>	LT673892	152458	36,8	81	8	39	128	94524

**Tabela 2.** Número absoluto de microssatélites. Os números entre parênteses representam a frequência (%) dos SSRs dos cloroplastos gênicos e intergênicos com base no tamanho do motivo para cada espécie.

Espécie	Di		Tri		Tetra		Penta	
	Gen	Int	Gen	Int	Gen	Int	Gen	Int
<i>A. coddii</i>	3(30)	7(70)	0	0	1(25)	3(75)	0	1(100)
<i>A. obliquum</i>	4(25)	12(75)	0	0	0	8(100)	0	1(100)
<i>A. sativum</i>	4(23)	14(77)	0	0	1(8,3)	11(91,7)	0	2(100)
<i>A. prattii</i>	4(25)	12(75)	0	0	0	11(100)	0	0
<i>A. victorialis</i>	4(25)	12(75)	0	0	0	12(100)	0	0
<i>A. cepa</i>	4(26,6)	11(73,4)	0	0	0	10(100)	0	3(100)
<i>A. macleanii</i>	4(26,6)	11(73,4)	0	0	2(22,2)	7(77,8)	0	2(100)
<i>A. fistulosum</i>	4(33,3)	8(66,7)	0	0	0	9(100)	0	4(100)
<i>A. schoenoprasum</i>	4(30,76)	9(69,24)	0	0	0	10(100)	0	2(100)
<i>A. nutans</i>	4(36,3)	7(63,7)	0	0	0	10(100)	0	2(100)
<i>A. cepa</i> (N)	4(26,6)	11(73,4)	0	0	0	10(100)	0	3(100)
<i>A. cepa</i> (S)	4(28,57)	10(71,43)	0	0	0	11(100)	0	4(100)
<i>A. ursinum</i>	4(44,4)	5(55,6)	0	0	1(16,6)	5(83,4)	0	5(100)
<i>A. paradoxum</i>	4(36,3)	7(63,7)	0	0	0	9(100)	0	0
<i>A. platyspatum</i>	5(31,25)	11(68,7)	1(33,3)	2(66,6)	2(25)	6(75)	1(20)	4(80)
TOTAL	60	147	1	2	7	132	1	33

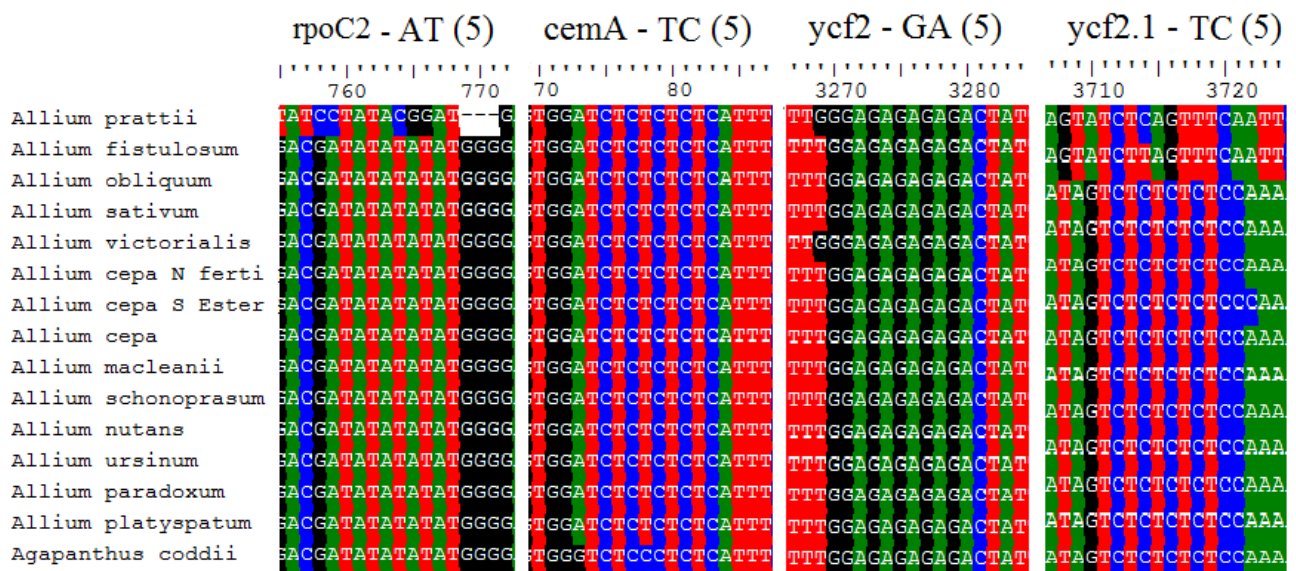
Gen (gênico); Int (intergênico)



**Tabela 3.** Lista de genes de plastídios que foram encontradas incomuns entre as quinze espécies de Amaryllidaceae incluídas no estudo comparativo. Os dados fora dos parênteses representam o motivo para cada repetição e a repetição do número de bases nitrogenadas.

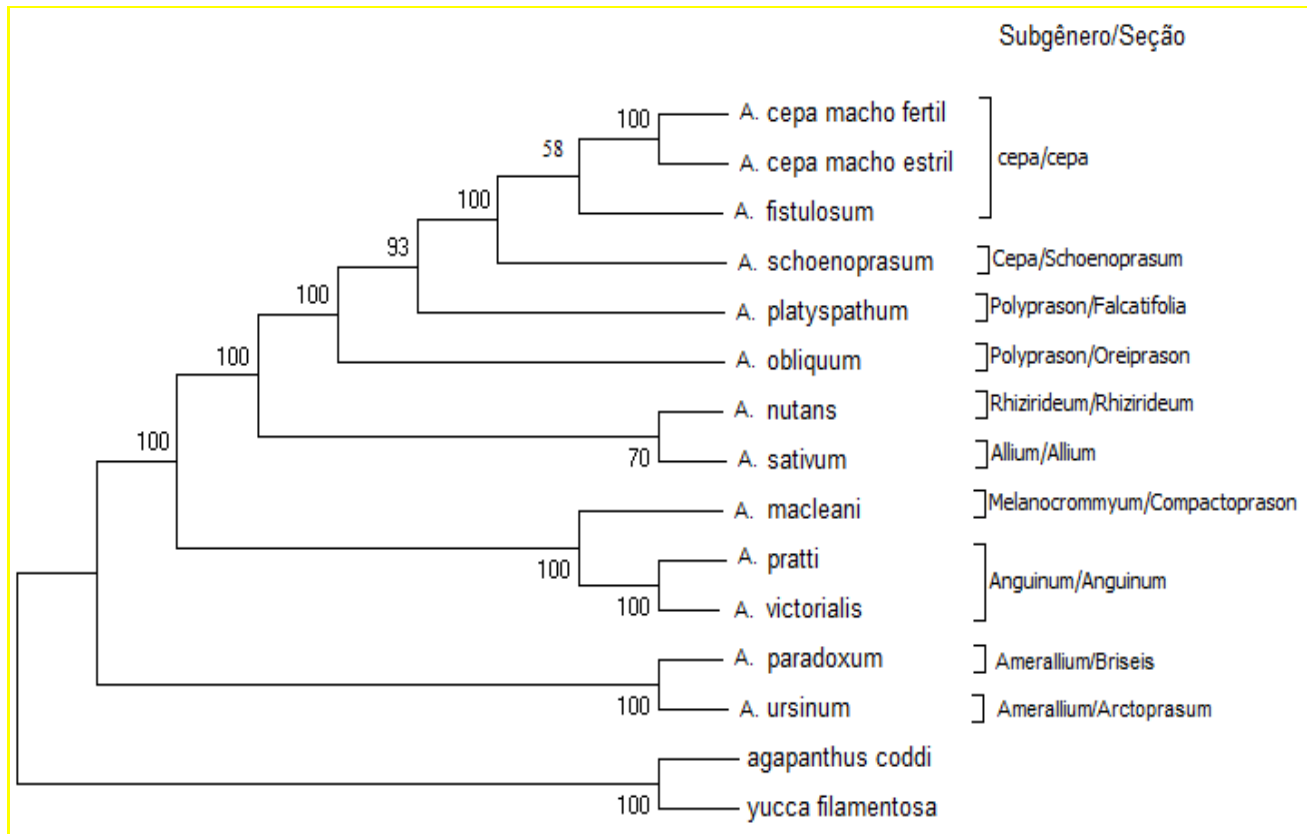
Espécies	Nome do gene			
	rpoC2	cemA	ycf2	ycf2.1
<i>A. coddii</i>	AT <sub>5</sub> (P)	I	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. obliquum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. sativum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. prattii</i>	I	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	I
<i>A. victorialis</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. cepa</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. macleanii</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. fistulosum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	I
<i>A. schoenoprasum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. nutans</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. cepa (N)</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. cepa (S)</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. ursinum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. paradoxum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)
<i>A. platyspatum</i>	AT <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)	GA <sub>5</sub> (P)	TC <sub>5</sub> (P)

P (perfeito); I (imperfeito)

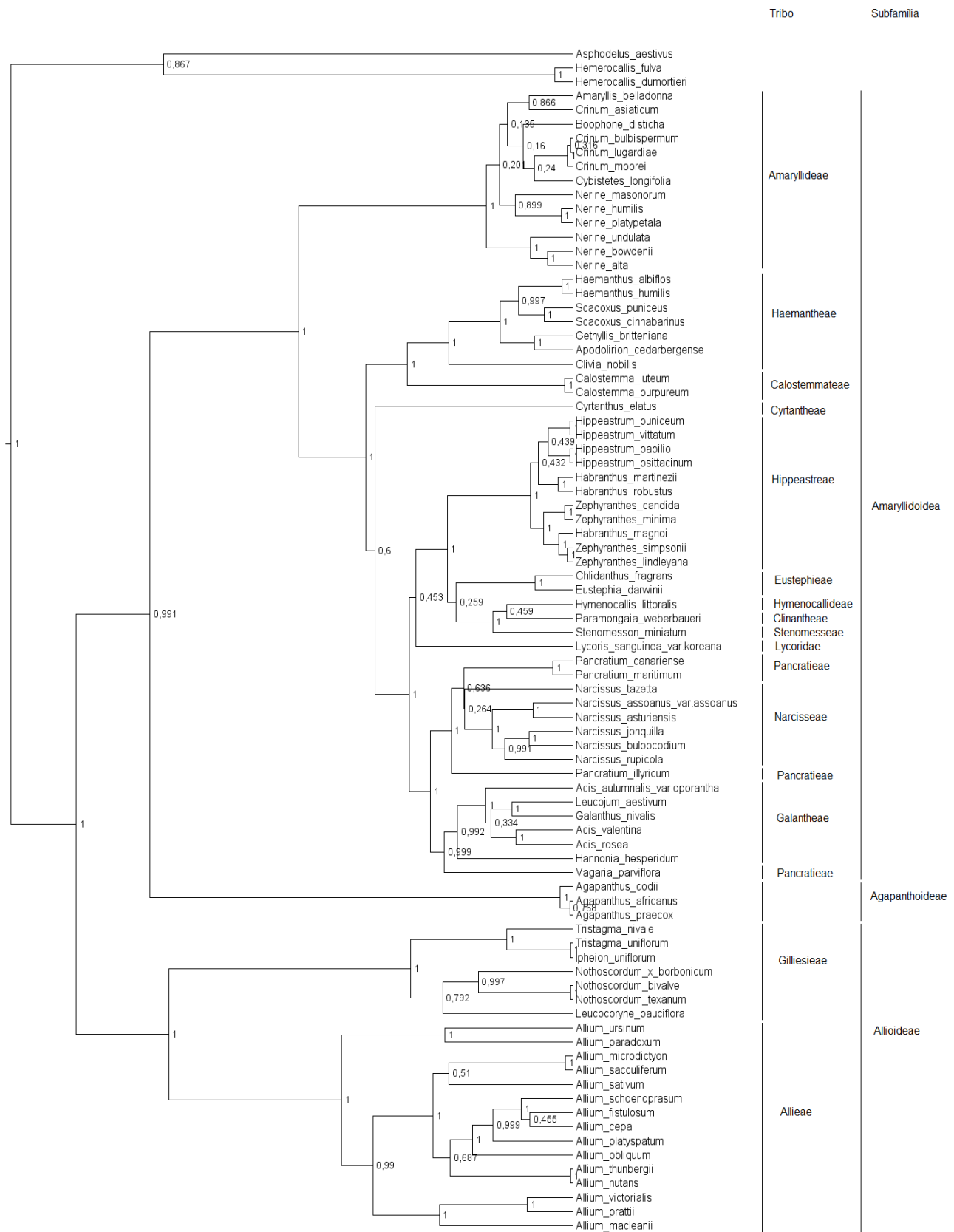


**Figura 1.** Alinhamento múltiplo de seqüências dos genes contendo microssatélites, em estudos da família Amaryllidaceae.





**Figura 3.** Filogenia do gênero *Allium* baseada em genomas plastidiais completos. Plastomas de *A. Obliquum* (NC\_037199.1), *A. sativum* (NC\_031829.1), *A. prattii* (NC\_037432.1), *A. victorialis* (NC\_037240.1), *A. cepa* (KM088013.1), *A. macleanii* (LT699703.1), *A. Fistulosum* (LT674586.1), *A. schoenoprasum* (LT699700.1), *A. nutans* (LT799837.1), *A. cepa* macho fértil (NC\_024813.1), *A. cepa* macho estéril (KF728079.1), *A. ursinum* (MH157875.1), *A. paradoxum* (LT622239.1) e *A. platyspathum* (LT673892.1). Foi incluída como grupo externo a espécie *Yucca filamentosa* (NC\_032712.1). A árvore filogenética foi gerada pelo software MEGA7, usando o método de máxima verossimilhança (ML), e o suporte de bootstrap foi calculado usando 1000 replicatas. Valores de suporte de bootstrap (%) são mostrados na interseção de cada ramo.



**Figura 4.** Filogenia da família Amaryllidaceae baseada em sequências do gene plastidial *matK*. A árvore filogenética foi gerada pelo software Beast, usando o método Bayesiano. Valores de suporte PP (%) são mostrados na interseção de cada ramo.

**Estudo Palinológico em Espécies de Amaryllidaceae**

---

**CAPÍTULO IV**

**Artigo a ser submetido à Revista Acta Botânica Brasilica (Qualis B1)**

## Estudo Palinológico em Espécies de Amaryllidaceae

Horace José Jimenez<sup>1,2</sup>, Antonio de Pádua de Oliveira Paula<sup>3</sup>, Genialdo Ramos dos Santos<sup>3</sup>, Silmar Luiz da Silva<sup>3</sup>, Reginaldo de Carvalho<sup>1,3</sup>

### RESUMO

As análises palinológicas são particularmente utilizadas como ferramenta de caracterização com objetivo de fornecer subsídios para inferências taxonômicas. Amaryllidaceae é uma família com grande importância econômica, especialmente para produção de híbridos comerciais, tanto para floricultura quanto agricultura. Neste sentido, a palinologia tem grande potencial de contribuir para seleção de genótipos candidatos a hibridação. O objetivo do trabalho foi caracterizar a morfologia, morfometria e estrutura do pólen de espécies de Amaryllidaceae. Vinte e cinco grãos de pólen de treze espécies foram analisados por meio da microscopia óptica e as descrições palinológicas para a maioria das espécies seguiram esta ordem: tamanho, forma, ângulo e aberturas. Os resultados obtidos revelaram a forma dos grãos de pólen como do tipo oblato e peroblato, monosulcados, comprimento equatorial maior dos grãos de pólen variando de 22,5 µm (*Griffinia gardeneriana*) a 145 µm (*Hymenocalis x Macrostephana* Hook) e comprimento equatorial menor dos grãos de pólen de 16,25 µm (*Griffinia gardeneriana*) a 93,75 µm (*Hymenocalis x Macrostephana* Hook). Os resultados indicam que a morfometria e a forma do pólen de espécies de Amaryllidaceae não são uma barreira para a ocorrência de híbridos.

**Palavras Chave:** Palinologia, Grão de Pólen, Amaryllidaceae, Híbridos.

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. Autor para correspondência e-mail: romulommfilho@yahoo.com.br.

## ABSTRACT

Palynological analyzes are particularly used as a characterization tool aiming to provide subsidies for taxonomic inferences. Amaryllidaceae is a Family of great economic importance especially for the production of comercial hybrids, both for floriculture and agriculture. In the sense, palynology has great potential to contribute to selection of genotypes candidates for hybridization. The objetive of this work was to characterize the morphology, morphometry and pollen structure of Amaryllidaceae species. Twenty-five pollen grains from thirteen species were analyzed by optical microscopy and the palynological descriptions for most species followed this order: size, shape, scope and apertures. The results indicated the shape of pollen grains as oblate and peroblate type, monusulcates, equatorial lengh greater of the pollen graisn varying of 22,5  $\mu\text{m}$  (*Griffinia gardeneriana*) to 145  $\mu\text{m}$  (*Hymenocalis x Macrostephana*) and smaller equatorial length of the pollen grains of 16,25  $\mu\text{m}$  (*Griffinia gardeneriana*) to 93,75  $\mu\text{m}$  (*Hymenocalis x Macrostephana*). The results indicate that the morphometry and pollen form of Amaryllidaceae species are not a barrier to the Occurrence of hybrids.

**Key words:** Palynology, Pollen Grain, Amaryllidaceae, Hybrids.

## INTRODUÇÃO

Amaryllidaceae Jaume St.-Hil são ervas bulbosas sendo compostas por cerca de 1600 espécies pertencentes a 20 tribos e 80 gêneros, de ampla distribuição, ocorrendo nas regiões tropicais e subtropicais (Stevens 2014). Na região Neotropical, a família está representada por cerca de 30 gêneros, ocorrendo no México, América Central e América do Sul. No Brasil encontramos os gêneros nativos *Zephyranthes* Herb., *Cearanthes* Ravenna, *Crinum* L., *Eithea* Ravenna, *Eucharis* Planch., *Griffinia* Ker-Gawler, *Habranthus* Herb., *Hippeastrum* Herb., *Hymenocallis* Salisb., *Nothoscordum* Kunth, *Rhodophiala* C., *Tocantinia* Ravenna, *Tristagma* Poepp. e *Worsleya* Traub, totalizando mais de 100 espécies além de representantes da subfamília Allioideae (Dutih e Oliveira 2015).

O conhecimento sobre a família no Brasil é escasso, com pequena quantidade de estudos taxonômicos realizados (Oliveira et al. 2008). Existem discussões entre os pesquisadores sobre a delimitação dos gêneros na família. As classificações para a Amaryllidaceae ainda não estão completamente determinadas, sendo constantemente reorganizadas, de modo que ainda não há um modelo seguro, limites precisos bem definidos e difundidos no meio científico (Meerow e Snijman 1998). Isto se reflete também dentro dos gêneros nativos brasileiros, para os quais o número total de espécies e suas delimitações taxonômicas ainda precisam de esclarecimento. A maioria dos trabalhos está baseado em material herborizado, o que se tem mostrado insuficiente para o reconhecimento dos táxons e a sua caracterização morfológica (Dutilh 1989).

A variabilidade morfológica encontrada nos vários tipos de pólen de angiospermas é resultado dos eventos evolutivos e ecológicos de interação entre plantas e seus polinizadores (Melhem et al. 2003), e é empregada como um instrumento útil em várias áreas do conhecimento, como cladística, ecologia e fitogeografia (Melhem et al. 2003). Variações no tamanho do pólen, forma, polaridade, simetria, estrutura de abertura, ornamentação da superfície e outras características podem ser aplicados em programas de melhoramento genético visando uma melhor compreensão dos híbridos artificiais e híbridos espontâneos encontrados na natureza gerados por meio do cruzamento (Pilarek et al. 2013). Os trabalhos têm sido fundamentados na análise de características únicas, quantitativas ou qualitativas, selecionadas de grãos de pólen (tamanho de pólen) de híbridos interespecíficos individuais (Pilarek et al. 2013). No entanto, os tamanhos dos pólenes de híbridos artificiais e interespecíficos são consideravelmente maiores que os de seus pais e que isso está relacionado à ploidia (Franssen et al. 2001, Rhee et al. 2005). Outros pesquisadores garantem que os híbridos (geralmente poliplóides) possuem tamanho de pólen parecido ou menor do que os de seus progenitores (Dommez 2008, Karlóttir et al. 2008).

Estudos palinológicos contendo espécies de Amaryllidaceae são escassos e, comumente, fazem parte de catálogos e/ou levantamentos polínicos. No trabalho desenvolvido por Bahadur et al. (2017), o autor ilustrou a morfologia polínica de vários gêneros distribuídos entre diversas espécies



de Amaryllidaceae, onde foi destacado a palinologia para a identificação de espécies. Da mesma forma, Rana et al. (2017), Gollosi et al. (2017) e Candido et al. (2013) analisaram a estrutura dos grãos de pólen de espécies dessa família. Os gêneros mais observados quanto à palinologia são *Crinum* L. (Erdtman 1966, Sharma 1967, Huang 1972), *Hymenocallis* Salisb. (Huang 1972, Alves-Araujo 2007, Bahadur et al. 2017), *Zephyranthes* Herb (Sharma 1967, Alves-Araujo 2007, Bahadur et al. 2017) e *Hippeastrum* (Alves-Araujo 2007, Candido et al. 2013, Bahadur et al. 2017).

Na região sul-americana, poucos são os trabalhos com relação à palinologia entre as espécies de Amaryllidaceae. Candido et al. (2013) analisaram os grãos de pólen de cinco espécies de *Hippeastrum* quanto à estrutura no estado do Rio de Janeiro, onde confirmou a identidade de todas as espécies. Martín et al. (2012) investigaram morfologia do pólen e a estrutura da exina de sete espécies de *Hymenocallis* na Venezuela, onde foi possível observar a estreita relação entre as espécies quanto a estrutura polínica. Meerow et al. (2015) descreveu por meio da morfologia polínica e caracteres morfológicos duas novas espécies dos gêneros *Stenomesson* e *Eucharis* Planch. endêmicas do Equador, conseguindo diferenciá-las das espécies representantes do gênero.

As análises palinológicas são de extrema importância e os dados obtidos com as mesmas podem ser utilizados em trabalhos de melhoramento genético possibilitando a obtenção de grãos de pólen com altas viabilidades e com as estruturas específicas que melhorem os resultados dos mesmos, assim como podem ser utilizados para diferenciar espécies dentro de um gênero e diagnosticar diferenças dentro de famílias botânicas (Menck et al. 1990). Tendo em vista o exposto, este artigo tem como objetivo caracterizar a morfologia, morfometria e estrutura do pólen de representantes de espécies de Amaryllidaceae usando as técnicas de microscopia óptica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O material polínico de 13 espécies da família Amaryllidaceae foi proveniente de material vegetal reprodutivo retiradas do Herbário Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (tabela 1). Para análise foi priorizada: (1) a extração de botões florais fechados,

para evitar contaminação por grãos de pólen de outras espécies;(2) grãos de pólen desenvolvidos, buscando a obtenção de grãos de pólen maduros. Os grãos de pólen obtidos das anteras coletadas foram armazenados em ácido acético glacial PA por 24 horas e, posteriormente, submetidos à técnica padrão de acetólise segundo Erdtman (1960). O tempo em que os grãos de pólen foram submetidos ao banho-maria variou conforme a resistência da exina as reações químicas.

Para análise em microscopia óptica (M.O.), as lâminas foram montadas em gelatina glicerinada, a partir das quais foram mensurados o diâmetro equatorial, maior e menor e mediana de 25 grãos de pólen, aleatoriamente (sempre que possível). Para definição da forma utilizou-se para o cálculo do diâmetro equatorial menor dividido pelo diâmetro equatorial maior. A análise da estatística descritiva foi realizada por meio do software BioEstat versão 5.3.

Os registros fotográficos foram feitos em um microscópio Zeiss (modelo Axioskop 2), por meio de sistema fotográfico digital acoplado ao mesmo (Olympus C-5060, 5.1 megapixel). As descrições palinológicas para a maioria das espécies seguiram esta ordem: tamanho, forma, âmbito, aberturas. Para tanto, foram seguidas as nomenclaturas palinológicas de Barth & Melhem (1988) e Punt et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCURSSÃO

### *Amaryllis* L.

A espécie *Amaryllis* sp. apresentou grãos de pólen grandes, monosulcados, oblato, com medidas do diâmetro equatorial menor e maior 38,25 e 57,5 µm respectivamente. A área do grão de pólen de *Amaryllis* sp foi de 1893,4 µm<sup>2</sup> (Tabela 1 e Figura 1C).

*Amaryllis* é usada extensivamente em paisagismo e para flores de corte em regiões tropicais e subtropicais, e mais de 300 cultivares são atualmente reconhecidas (Jamil et al. 2016). Países Baixos, África do Sul, Japão, Brasil e Estados Unidos têm sido os principais exportadores de variedades de *Amaryllis*. Centenas de cultivares, ou híbridos foram criados amplamente para vários tipos de

produção de plantas em todo o mundo (Vazquez et al. 2015). Espécies diplóides tem sido cruzada com cultivares tetraplóides comerciais mais antigas, com o objetivo de gerar progênies triplóides ou tetraplóides que exibem características gigantescas de plantas poliplóides (Meerow 2014).

### ***Griffinia* Ker Gawler**

A espécie *G. gardeneriana* apresentou grãos de pólen pequenos, sendo monosulcados, e medidas do diâmetro equatorial menor e maior 16,25 e 22,5 µm respectivamente (Tabela 1). Em relação a forma do pólen, a espécie foi do tipo oblato. Alves-Araujo et al. (2007) trabalhando com as espécies *Griffinia gardneriana* (Herb.) Rav no estado de Pernambuco apresentou resultados pouco semelhantes. O autor obteve grãos de pólen grandes, peroblato a oblatos sendo ambos elipsoidais, medindo 39,3 e 85,5 µm quanto ao diâmetro equatorial menor e maior. A variação no tamanho do grão de pólen foi observada em híbridos, estando relacionado ao nível de ploidia  $2n = 3x = 30$  (Meerow et al. 2002). Em *G. espiritensis* um triplóide é o resultado da hibridização entre um diplóide ( $n=10$ ) e um tetraplóide natural ( $n=20$ ) (Meerow et al. 2002). Essa variação quanto ao tamanho do pólen que representantes da família apresenta não significa uma barreira para o cruzamento natural entre os representantes do gênero para formação de híbridos. Para programas de melhoramento, Clones triplóides de *G. espiritensis* têm sido desenvolvidos para ornamentação. Seleções estão sendo propagadas para estudos em estufa e câmara de crescimento sobre os efeitos da temperatura e do fotoperíodo na floração (Meerow et al. 2002).

### ***Habranthus* Herb.**

#### ***Habranthus itaobinus* Ravenna**

A espécie *H. itaobinus* apresentou grãos de pólen grande e monosulcados. Os diâmetros equatoriais menor e maior foram 45 e 65 µm respectivamente (Figura 1F). *Habranthus* sp. apresentou grãos de pólen médio, com medidas do diâmetro equatorial menor e maior de 27,5 e 35 µm respectivamente (Figura 1J). A área dos grãos de pólen foram 2.494,3 e 904 µm<sup>2</sup> em *H. itaobinus* e

*Habranthus* sp. respectivamente (Tabela 1). Quanto à forma do pólen, as espécies foram do tipo oblato. Alves-Araujo et al. (2007) trabalhando com as espécies *H. itaobinus* no estado de Pernambuco apresentou grãos de pólen grandes, peroblato a oblatos, onde para a espécie *H. itaobinus* obteve medidas para o diâmetro equatorial menor e maior de 30,33 e 63,6  $\mu\text{m}$  respectivamente.

Um fator que potencializa o uso do *H. itaobinus* para a ornamentação e o melhoramento é a ocorrência da hibridização interespecífica. *H. itaobinus* apresenta ampla variação morfológica, e essa variação parece não estar relacionada a fatores ambientais, e sim a plasticidade genética dos indivíduos (Oliveira 2006). Essa variação quanto ao tamanho do pólen que a espécie apresenta não impede o uso do *Habranthus itaobinus* Ravenna para ornamentação e o melhoramento para a obtenção de plantas com características desejadas.

### ***Habranthus sylvaticus* Baker**

A espécie *H. sylvaticus* apresentou grãos de pólen grandes, monosulcados, onde os diâmetros equatoriais menor e maior foram 67,5 e 72,5  $\mu\text{m}$  respectivamente e área média do pólen 4201,9  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 1).

Em relação à forma do pólen, a espécie foi do tipo oblato, pois o eixo polar foi mais curto do que o diâmetro equatorial. Zavada (1983) considerou que os grãos de pólen em *Habranthus* sp. são geralmente grandes, elípticos em forma de barco, exina reticulada, e a parede semitetada-columelada. Alves-Araujo et al. (2007), no entanto, encontrou grãos de pólen grandes, peroblato a oblatos, onde para a espécie *H. sylvaticus* Herb. obteve medidas para o diâmetro equatorial menores do que reportado neste trabalho.

### ***Hippeastrum* Herb.**

#### ***Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze**

A espécie *H. puniceum* apresentou grãos de pólen pequenos, monosulcados e diâmetros equatorial menor e maior 22,5 e 42,5  $\mu\text{m}$  (Figura 1I) (Tabela1). A forma do pólen é do tipo peroblato,

pois a relação entre o eixo polar e o diâmetro equatorial é inferior a 0,50. A área do grão de pólen de *H. puniceum* é de 782,5  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 1).

Alves-Araujo et al. (2007) descreveu *H. puniceum* apresentando grãos de pólen grandes, peroblatos, amb elipsoidal, onde para a espécie *H. puniceum* obteve medidas para o diâmetro equatorial menor e maior de 45 e 94  $\mu\text{m}$  respectivamente. O mesmo se verifica no trabalho de Candido et al. (2013), que trabalhando com *H. puniceum* relatou grãos de pólen grande a muito grande medindo 37,5 e 78,75  $\mu\text{m}$  para o diâmetro equatorial menor e maior.

Em relação à variação de grãos de polén, Bahadur et al. (2017) trabalhando com a espécie *Hippeastrum reginae* no Paquistão obteve grãos de pólen grandes, com medidas para o diâmetro equatorial menor e maior de 50 e 60 $\mu\text{m}$ . Segundo Traub (1963) a variação em relação às formas e tamanhos diferentes dos grãos de pólen em espécies do gênero *Hippeastrum* pode ser explicada pela vasta ocorrência de poliploidia nas espécies. Embora se tenha observado variações no tamanho dos grãos de pólen, esta não tem efeito limitante na produção de híbridos em *Hippeastrum* que é um gênero com grande potencial ornamental (Hardman 1997).

Hardman (1997) fala que a maioria das espécies do gênero apresenta auto-incompatibilidade, sendo comum existência de híbridos por meio do cruzamento entre espécies do mesmo gênero. De acordo com Duthil (1987), a maioria das espécies do gênero é diplóide com  $2n=22$ . Meerow (1992) discute que todos os híbridos que existem atualmente são tetraplóides, devido a seleção de progenia tetraplóide, associada com maior tamanho da flor. Segundo Meerow (2000) os programas de melhoramento genético em *Hippeastrum* têm focado na introgressão de caracteres morfológicos, de resistência e rusticidade a partir de cruzamentos entre cultivares já conhecidos, o que tem levado a uma grande complexidade de parentescos e diluição das características das espécies componentes originais.

***Hippeastrum Stylosum* Herb.**

A espécie *H. stylosum* apresentou grãos de pólen grandes, monosulcados, onde os diâmetros equatoriais menor e maior foi 43,75 e 82,5  $\mu\text{m}$  respectivamente. Quanto à forma do pólen, foi do tipo peroblato e a área do pólen de *H. stylosum* foi de 3.430  $\mu\text{m}^2$  (Figura 1H).

Alves-Araujo et al. (2007) trabalhando com a espécie *H. stylosum* no estado de Pernambuco apresentou resultados muito semelhantes. O autor obteve grãos de pólen grandes, peroblato, amb elipsoidal, onde para a espécie *H. stylosum* obteve medidas para o diâmetro equatorial menor e maior de 41,3 e 89,3  $\mu\text{m}$ . O autor fala que foi observada grandes variações quanto à morfologia floral e foliar em diferentes populações de *H. stylosum* o que se supõe que a ocorrência de panmixia entre os indivíduos independe da variação do tamanho do grão de pólen. Segundo Dutilh (1996), não ocorre barreira efetiva para o cruzamento entre as espécies, havendo introgressão e hibridização aparente o que favorece para o incremento da variabilidade morfológica das espécies.

***Hymenocallis* Salisbury**

*Hymenocallis x Macrostephana* Baker apresentou grãos de pólen grandes, monosulcados, apresentando medidas do diâmetro equatorial menor e maior 93,75 e 145  $\mu\text{m}$  respectivamente. Quanto à forma do pólen, é do tipo peroblato (Tabela 1). Alves-Araujo et al. (2007) descreveram grãos de pólen grandes, peroblato a oblatos, medindo 100 e 169,6  $\mu\text{m}$  quanto ao diâmetro equatorial menor e maior para a *H. littoralis* Salisb. Resultados pouco semelhantes também foi encontrado no trabalho de Bahadur et al. (2017), onde o autor obteve grãos de pólen grandes (a gigante), com medidas para o diâmetro equatorial menor e maior de 62,5 e 90  $\mu\text{m}$  para a espécie *Hymenocallis littoralis* Salisb. A área do grão de pólen de *Hymenocallis x Macrostephana* Baker foi de 8592,9  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 1).

Martin et al. (2012) trabalhando com sete espécies de *Hymenocallis* na Venezuela obteve grãos de pólen grandes, com medidas variando de 125 a 155  $\mu\text{m}$  em relação ao diâmetro equatorial maior para as espécies, obtendo assim resultados muito semelhantes. O autor considerou o pólen como monossulcato e heteropolar, com simetria bilateral. A ocorrência de poliploidia nas espécies

podia explicar a diferença de tamanho do grão de pólen das espécies de *Hymenocalis* em relação aos outros gêneros da família Amaryllidaceae, onde seu maior volume poderia estar relacionado à sua suposta origem tetraplóide andina (Meerow et al. 2000). Raymúndez (1997) cita que as espécies variam de  $2n=24$  a  $2n=112$ , estabelecendo assim o gênero como uma das mais amplas faixas de números cromossômicos dentro da família (Meerow 1984).

### ***Narcissus* L.**

As espécies *N. bulbocodium* L., *N. cyclamineus* DC. e *N. triandus* L. apresentaram grãos de pólen médio, monosulcados, onde os diâmetros equatoriais menor e maior da espécie *N. bulbocodium* Lin foi de 26,25 e 47,5  $\mu\text{m}$  (Tabela 1 e Figura 1B). O diâmetro equatorial menor e maior da espécie *N. cyclamineus* DC mediram 36,25 e 55  $\mu\text{m}$  respectivamente (Tabela 1 e Figura 1D). Os diâmetros equatoriais menor e maior da espécie *N. triandus* L foram de 20 e 40  $\mu\text{m}$  respectivamente (Figura 1A). As medidas das áreas das espécies *N. bulbocodium* L., *N. cyclamineus* DC. e *N. triandus* L foram de 937,1  $\mu\text{m}^2$ , 1679,2  $\mu\text{m}^2$  e 738,2  $\mu\text{m}^2$  respectivamente (Tabela 1).

Para o gênero *Narcissus*, a variação no tamanho do pólen parece não dificultar o cruzamento de espécies do gênero para formação de híbrido. Segundo Ribeiro e Freitas (2007), várias espécies de *Narcissus* hibridizam na natureza, onde tem se observado que as progênies híbridas geralmente revelam-se estéreis. Marques et al. (2007) discute que as flores de *Narcissus* são polinizadas mediante uma gama de polinizadores e os híbridos são freqüentemente relatados. Embora os híbridos *N. cavanillesii*  $\times$  *N. serotinus* ( $x=7$ ) e *N. cavanillesii*  $\times$  *N. miniatus* ( $x=5$ ) pertencerem a diferentes subgêneros, Soler (1998) fala que cruzamentos interespecíficos entre essas duas espécies parentais ocorrem e várias populações selvagens são conhecidas de locais distintos na Península Ibérica.

### ***Nothoscordum* Ravenna**

A espécie *N. pernambucanum* Ravenna apresentou grãos de pólen médios, monosulcados, peroblatos e diâmetro equatorial menor e maior 23,75 e 42,5  $\mu\text{m}$  respectivamente (Tabela e Figura 1G). A área do grão de pólen de *N. Pernambuco* foi de 1.488,8  $\mu\text{m}^2$ .

Nothoscordum apresenta um grande número de híbridos, dentre eles *N. gracile*. A espécie pode ser encontrada como citotipo diploide, apesar de que para o melhoramento genético o tetraploide apomítico possui o potencial de otimizar a produção agrícola, visto que essa característica permite a maximização da produção através da fixação do vigor híbrido, evitando perdas devido a problemas de polinização (Dall'agnol 2005).

### ***Zephyranthes* Herb.**

A espécie *Zephyranthes* sp. apresentou grãos de pólen grandes, monosulcados, oblato, pois o eixo polar foi mais curto do que o diâmetro equatorial, apresentando medidas do diâmetro equatorial menor e maior 36,25 e 57,5  $\mu\text{m}$  respectivamente. A área do grão de pólen de *Zephyranthes* sp foi de 1.306,8  $\mu\text{m}^2$  (Tabela 1 e Figura 1E).

Segundo Dutilh et al. (2005), o gênero *Zephyranthes* apresenta potencial ornamental, pois além da sua beleza natural, apresenta grande número de sementes férteis e formas de propagação sexuada e assexuada. De acordo com Flory e Smith (1980), a poliploidia em muitas espécies otimiza a utilização de *Zephyranthes* como ornamental e para o melhoramento. Daviña (2001) trabalhando com populações naturais de *Zephyranthes* e Flory e Smith (1980) com híbridos cultivados encontraram poliploidia e variação cromossômica no gênero. Para o gênero *Zephyranthes*, a variação no tamanho do polén parece não dificultar o cruzamento de espécies do gênero para formação de híbridos.

### **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos indicam que a morfometria e a forma do pólen de espécies de Amaryllidaceae não são uma barreira para a ocorrência de híbridos.



## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi realizado com recursos gerados por bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Horace J. Jimenez, Antonio de Pádua de Oliveira Paula, Genialdo Ramos dos Santos e Silmar Luiz da Silva como bolsistas de doutorado CAPES.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Araújo AA, Santos FAR, Alves M (2007) Caracterização palinológica de espécies de Amaryllidaceae sensu stricto ocorrentes no nordeste brasileiro. **Acta bot. bras.** **21**: 967-976.
- Bahadur S, Ahmad M, Mir S, et al. (2017) Identification of monocot flora using pollen features through scanning electron microscopy. **Microsc Res Tech.** **81**: 599-613. <https://doi.org/10.1002/jemt.23015>
- Barth OM e Melhem TS (1988) **Glossário ilustrado de palinologia**. Ed. Unicamp. Campinas. 75p.
- Candido R S, Fourny A C da S, Goncalves-Esteves, Vania & Lopes, Rosana C (2013) *Hippeastrum* species in areas of restinga in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Bot. Bras.** **27**: 661-668
- Dall'agnol Miguel, Schifino- Wittmann, Maria T (2005) Apomixia, Genética e Melhoramento de Plantas. Pelotas. **R. Bras. Agrociência.** **11**: 127-133.
- Daviña JR (2001) **Estudio citogeneticos en algunos generos argentinos de Amaryllidaceae**. Cordoba. Tese (Doutorado)- Univerddidade Nacional de Cordoba.
- Dönmez E O (2008) Pollen morphology in Turkish Crataegus (Rosaceae). **Botânica Helvetica** **118**: 59-70.
- Dutilh JHA, Oliveira RS (2015) **Amaryllidaceae**. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB43>
- Dutilh JHA (1996) **Biosistemática de quatro espécies de *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae)**. D.Sc. Dissertation, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

- Dutilh JHA (1989) Morphological variation in a population of *Hippeastrum* Herb. **Herbertia**. **45** 152-155.
- Dutilh JHA (1987) **Investigações citotaxonômicas em populações brasileiras de *Hippeastrum* Herb.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Campinas, UNICAMP: Instituto de Biologia.
- Dutilh JHA (2005) Ornamental bulbous plants of Brazil. **Acta Hort** **683**: 37-42
- Erdtman G (1966) **Pollen morphology and plant taxonomy**. Angiosperms. 2 ed. Hafner, New York. 553p.
- Erdtman G (1960) The acetolysis method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift** **54**: 561-564.
- Flory WS, Smith GL (1980) High chromosome number in several Zephyrantheae taxa. Reino Unido. **Plant Life** **36**: 63-72.
- Franssen AS, Skinner DZ, Al-Khatib K, Horak MJ (2001) Pollen morphological differences in *Amaranthus* species and interspecific hybrids. **Weed Science**. **49**: 732-737.
- Gollosi A, Gezim K, Lika M, Dauti A, Pupuleku B, Kallajxhiu N (2017) The Palynomorphological Characteristics of Amaryllidaceae in Albania. **Int. Environmental Application & Science** **12**: 318-324.
- Hardman C (1997) Trends in modern *Hippeastrum* hybridizing. Pasadena. **Herbertia** **52**: 168-178.
- Huang T (1972) **Pollen flora of Taiwan**. National Taiwan University Botany Department Press.
- Jamil MK, Rahman MM, Hossain MM, Hossain MT, Karim AS (2016) Influence of sucrose and aluminium sulphate vase life of cut *Hippeastrum* flower (*Hippeastrum hybridum* Hort.) as influenced. **Bangladesh J Agri Res**. **41**: 221–234.
- Karlsdóttir L, Hallsdóttir M, Thórsson AT, Jónsson AK (2008) Characteristics of pollen from natural triploid *Betula* hybrids. **Grana** **47**: 52-59.
- Martín J, Raymúndez M, Vallès J, Garnatje T, Raimúndez E (2012) Palynological study of the Venezuelan species of the genus *Hymenocallis* (Amaryllidaceae). **Plant Systematics and Evolution** **298**: 695-701. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/43496781>

- Marques I, Graell RA, Draper D, Iriondo JM (2007) Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). **American Journal of Botany** **94**: 1352-1359.
- Meerow AW (2000) Breeding Amaryllis. Pasadena. **Herbertia** **54**: 67-83.
- Meerow AW, Snijman DA (1998) Amaryllidaceae. In: Kubitzki, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants III. Flowering plants. Monocotyledons. Liliaceae (except Orchidaceae). Berlin. **Springer**. 83-110.
- Meerow AW, Kane MF, Broschat TK (1992) Breeding of new Hippeastrum cultivars using diploid species. Wageningen. **Acta Horticulturae** **325**: 583-588.
- Meerow AW, Preuss KD, Tombolato AF (2002) GrifJinia (Amaryllidaceae), a critically endangered Brazilian geophyte with horticultural potencial. **Acta Horticulturae** **570**: 57-64.
- Meerow A (1984) Karyotype evolution in the Amaryllidaceae. **Herbertia** **40**: 139-154.
- Meerow AW (2014) The Florida Series of Hybrid Amaryllis: Five New Hippeastrum Cultivars. **Hortscience** **49**: 1102-1107. 2014.
- Meerow AW, Jost L, Oleas N (2015) Two new species of endemic Ecuadorean Amaryllidaceae (Asparagales, Amaryllidaceae, Amarylloideae, Eucharideae). **PhytoKeys** **48**: 1-9. doi:10.3897/phytokeys.48.4399
- Menck ALM, Et al. (1990) **Influência do sistema de coleta de botões florais na viabilidade de pólen de Eucalyptus spp.** IPEF. Piracicaba. 43:20-23.
- Melhem TS, Cruz-Barros MAV, Corrêa MAS, Makino-Watanabe H, Silvestre Capelato MSF, Golçalves-Esteves VL (2003) Variabilidade Polínica em Plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil). **Boletim do Instituto de Botânica de São Paulo** **16**: 1- 104.
- Oliveira RS De, Dutilh JHA, Sano PT (2008) Flora da Serra do Cipó: Amaryllidaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** **26**: 35–39
- Oliveira RS (2006) **Flora da Cadeia do Espinhaço: Zephyranthes Herb. & Habranthus Herb. (Amaryllidaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 165p

Pilarek DW, Bocianowski J, Jagodziński AM (2013) Pollen Features of Selected Crataegus Taxa. **Bot J Linn Soc.** **172**: 555-571. doi:10.1111/boj.12033

Punt W, Blackmore S, Nilsson S, Le Thomas A (2007) Glossary of pollenn and spore terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology** **143**: 1-81.

Raymúndez MB (1997) **Estudios citogenéticos, embriológicos y morfoanatómicos en especies venezolanas del género Hymenocallis Salisb. (Amaryllidaceae)**. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Rana NSK, Sharma HK, Meena T, Thakur RK (2017) Palynological Studies to Determine Pollen Resources of *Bombus haemorrhoidalis* Smith. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** **6**: 2590-2602.

Rhee HK, Cho HR, Kim KJ, Kim KS (2005) **Comparison of pollen morphology in interspecific hybrid lilies after in vitro chromosome doubling**. In IX International Symposium on Flower Bulbs. 673:639-643.

Ribeiro P, Paiva J, Freitas H (2007) *Narcissus* × *caramulensis* (Amaryllidaceae), a new hybrid for the portuguese flora. **Anales del Jardín Botánico de Madrid** **64**: 43-46.

Sharma M (1967) Pollen morphology of Indian monocotyledons. **Journal of Palynology** 1-98.

Soler JX (1998) Descubrimiento de *Narcissus perezlarae* Font Quer (Amaryllidaceae) en el Levante español. **Anales del Jardín Botánico de Madrid** **56**: 165-166.

Stevens PF (2014) **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 13. 2014 em diante. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>

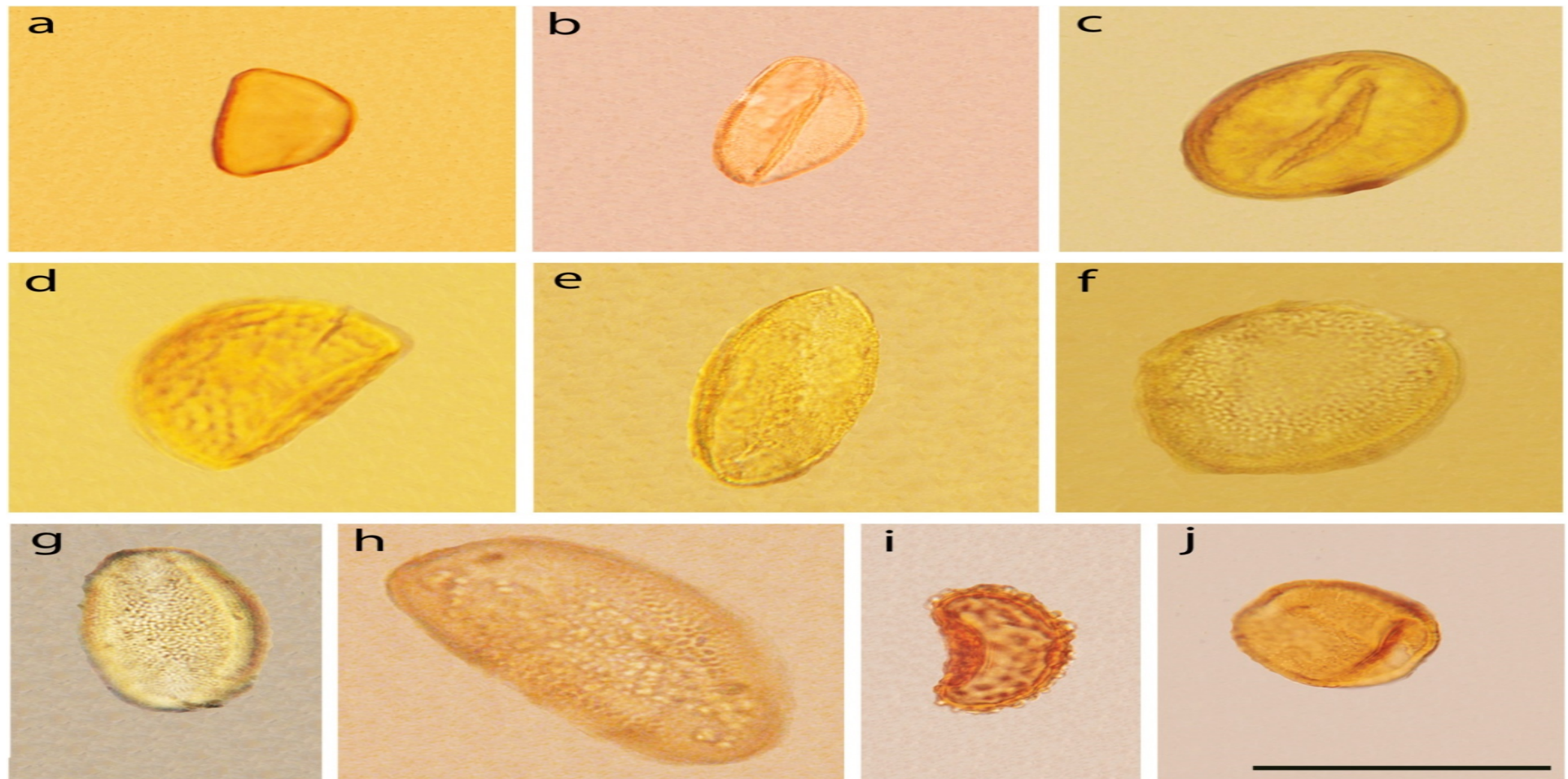
Traub HP (1963) **Genera of the Amaryllidaceae**. American Plant Life Society, California, La Jolla.

Vazquez C, Reed S T, Dunn C (2015) Nitrogen Fertilization as Ammonium or Nitrate-N on *Hippeastrum hybridum* BulbGrowth. **Agr Sci.** **6**: 1547-1554.

Zavada MS (1983) Comparative morphology of monocot pollen and evolutionary trends of apertures and wall structures. **Botanical Review** **49**: 331-379.

**Tabela1.** Características palinomorfológicas de espécies de Amaryllidaceae.

Espécie	Forma dos grãos de pólen	Número do sulco	Comprimento equatorial maior dos grãos de pólen ( $\mu\text{m}$ )			Comprimento equatorial menor dos grãos de pólen ( $\mu\text{m}$ )			Área dos grãos de pólen ( $\mu\text{m}^2$ )
			Maior	Mediana	Menor	Maior	Mediana	Menor	
<i>Amaryllis</i> sp	Oblato	Monosulcado	65,0	57,5	55,0	42,5	38,25	35,0	1893,4
<i>Griffinia gardneriana</i>	Oblato	Monosulcado	22,5	22,5	20,0	20,0	16,25	12,5	-
<i>Habranthus itaobinus</i>	Oblato	Monosulcado	70,0	65,0	47,5	47,5	45,0	42,5	2494,3
<i>Habranthus</i> sp	Oblato	Monosulcado	35,0	32,5	30,0	32,5	27,5	22,5	904
<i>Habranthus sylvaticus</i>	Oblato	Monosulcado	75,0	72,5	70,0	72,5	67,5	62,5	4201,9
<i>Hippeastrum puniceum</i>	Peroblato	Monosulcado	45,0	42,5	40,0	25,0	22,5	20,0	782,5
<i>Hippeastrum stylosum</i> Herb	Peroblato	Monosulcado	90,0	82,5	75,0	50,0	43,75	37,5	3430
<i>Hymenocallis Litorallis</i>	Peroblato	Monosulcado	167,5	145,0	112,5	112,5	93,75	75,0	8592,9
<i>Narcissus bulbocodium</i> Lin	Peroblato	Monosulcado	52,5	47,5	42,5	32,5	26,25	20,0	937,1
<i>Narcissus cyclamineus</i> DC	Peroblato	Monosulcado	57,5	55,0	52,5	40,0	36,2	32,5	1679,2
<i>Narcissus triandus</i> Linn	Peroblato	Monosulcado	40,0	437,5	35,0	22,5	20,5	17,5	738,2
<i>Nothoscordum pernambucanum</i>	Peroblato	Monosulcado	42,5	41,2	40,0	27,5	23,7	20,0	1488,8
<i>Zephyranthes</i> sp	Oblato	Monosulcado	65,0	57,5	52,5	40,0	36,2	32,5	1306,8



**Figura 1 (A-J).** Grãos de pólen de Amaryllidaceae. **A.** *Narcissus triandus* L. **B.** *Narcissus bulbocodium* L. **C.** *Amaryllis* sp. **D.** *Narcissus cyclamineus* DC. **E.** *Zephyranthes* sp. Herb. **F.** *Habranthus itaobinus* Ravenna. **G.** *Nothoscordum pernambucanum* Ravenna. **H.** *Hippeastrum stylosum* Herb. **I.** *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze e **J.** *Habranthus* sp Herb.

