



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**Citogenética, Palinologia e Genética Molecular *in silico* da
tribo Ingeae Benth. (Leguminosae Adans.)**

Genialdo Ramos dos Santos

Recife-PE

2019

Genialdo Ramos dos Santos

**Citogenética, Palinologia e Genética Molecular *in silico* da
tribo Ingeae Benth. (Leguminosae Adans.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Botânica.

Orientador:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Recife-PE

2019

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

S237c Santos, Genialdo Ramos dos
Citogenética, palinologia e genética molecular *in silico* da tribo
Ingeae Benth. (Leguminosae Adans.) / Genialdo Ramos dos Santos.
- 2019.

87 f.: il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Recife,
BR-PE, 2019.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Citogenética 2. Palinologia 3. Genética molecular
 4. Cromossomos 5. Leguminosa I. Carvalho, Reginaldo de, orient.
- II. Título

CDD 581

GENIALDO RAMOS DOS SANTOS

**Citogenética, Palinologia e Genética Molecular *in silico* da tribo Ingeae
Benth. (Leguminosae)**

Orientador:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Avaliadores:

Dra. Ana Virgínia de Lima Leite – UFRPE (Titular)

Dra. Margareth Ferreira de Sales – UFRPE (Titular)

Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira – UFPE (Titular)

Dr. Rodrigo César Gonçalves de Oliveira – UFPE (Titular)

Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal – UFPE (Suplente)

Dr. Cícero Carlos de Almeida – UFAL (Suplente)

Dedicatória

A quem me deu a vida e me ensinou ser o que hoje sou,
A quem jamais deixou de me apoiar, e
que sempre estará intercedendo por mim, e me abençoando todos os dias...

Maria Cícera dos Santos Silva

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Deus por sempre abrir portas em minha vida e me fazer encherá-las, assim como me orientar e proteger durante minha caminhada.

Aos meus pais Gerivaldo Ramos da Silva e Maria Cicera dos Santos Silva.

Aos meus irmãos Geniclesio Ramos dos Santos, Givaldo Ramos dos Santos e Giselda Ramos dos Santos.

A minha amada esposa Shanne Cristina da Silva, a minha enteada Andréia, e minhas queridas filhas Gabriela e Manuela.

Enfim...

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Programa de Pós-graduação em Botânica (PPGB), ao Laboratório de Citogenética Vegetal da UFRPE.

Aos fiéis amigos e colegas de laboratório Maria Angélica, Antônio de Padua, Silmar, Horace e Vanessa, não só pela amizade, mas também na colaboração dos trabalhos desenvolvidos nesta tese e em trabalhos paralelos.

Ao professor Dr. Reginaldo de Carvalho pela credibilidade, incentivo e principalmente pela orientação durante a realização deste projeto.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da UFRPE, pela dedicação em transmitir o conhecimento adquirido contribuindo com minha formação.

À Kênia e Cynara pela eficiência e todo apoio prestado na secretaria do PPGB.

Aos membros da Banca Drs: Ana Virgínia de Lima Leite, Margareth Ferreira de Sales, Maria Betânia Melo de Oliveira, Rodrigo César Gonçalves de Oliveira, Ana Christina Brasileiro Vidal e Cícero Carlos de Almeida pelas sugestões e contribuições para melhorias desta tese.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	10
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
Familia Leguminosae Adans.....	5
Tribo Ingeae Benth.....	6
Citogenética da Tribo Ingeae Benth.....	7
Citogenética comparativa.....	8
Utilização da Palinologia na Caracterização e Diferenciação de Espécies na Tribo Ingeae Benth,	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
MANUSCRITO I: "Sopa Meristemática": Adaptação de técnicas citogenéticas para preparação de lâminas cromossômicas de alta qualidade em espécies vegetais.....	11
RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E METODOS.....	15
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO.....	19
CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIA.....	21
APÊNDICES.....	25
MANUSCRITO II: Caracterização palinológica de espécies da Tribo Ingeae Benth (Ênfase para o Gênero <i>Inga</i> Mill.), Nordeste do Brasil.....	39
RESUMO.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
MATERIAL E METODOS.....	34
RESULTADOS.....	35
DISCUSSÃO.....	42
REFERÊNCIA.....	44
APÊNDICES.....	47

<u>MANUSCRITO III: Evolução cromossômica: duplicação cromossômicas em</u> <i>Calliandra Benth.</i> são as principais fontes de diversificação.....	58
RESUMO.....	59
INTRODUÇÃO.....	60
MATERIAL E METODOS.....	61
RESULTADOS.....	62
DISCUSSÃO.....	63
REFERÊNCIA.....	66
APÊNDICES.....	70

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito I

Figura I. Figura esquemática do espalhamento da sopa meristemática na lâmina e sua volatilidade no tempo de cinco segundos. A – Solução fixadora com Metanol/Ácido acético 3:1(v/v) e B – Solução fixadora com Etanol/Ácido acético 3:1 (v/v)..... 28

Figura II. Células metafásicas coradas com CMA (amarelo) / DAPI (azul). A - *Canna indica*, 2n = 18; B – *Citrullus lanatus*, 2n = 22; C – *Cucumis melo*, 2n = 24; D – *Cucumis anguria*, 2n = 24; E – *Erigium foetidum*, 2n = 16; F – *Inga capitata*, 2n = 52; G – *Inga laurina*, 2n = 26; H – *Inga ingoides*, 2n = 26; I – *Inga striata*, 2n = 26; J – *Ipomoea bahiensis*, 2n = 30; K – *Ipomoea hederifolia*, 2n = 30; L – *Luffa cylindrica*, 2n = 26; M – *Lagenaria vulgaris*, 2n = 22; N – *Merremia aegyptia*, 2n = 30; O – *Merremia cissoides*, 2n = 30; P – *Manihot reniformis*, 2n = 36. Todas as barras têm valor de 10µm..... 29

Manuscrito II

Figura I. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Abarema cochleata* (Willd.) Barneby & J. W. Grimes, (B) *Abarema cochlicarpos* (Gomes) Barneby & J. W. Grimes, (C) *Abarema langsdorffi* Benth., (D) *Albizia lebeck* (L.) Benth., (E) *Abarema turbinata* (Benth.) Barneby & J.W.Grimes, (F) *Albizia polycephala* (Benth.) Killip., (G) *Albizia saman* (Jacq.) Merr.; (H) *Albizia subdimidiata* (Spring.) Barneby & J. W. Grimes; (I) *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke. Todas as barras são iguais a 50µm..... 47

Figura II. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Calliandra bella* Benth., (B) *Calliandra brevipes* Benth., (C) *Calliandra parvifolia* (Hook. & Arn.) Speg.; (D) *Calliandra surinamensis* Benth., (E) *Calliandra bahiana* var *erythematosa* Barneby, (F) *Calliandra lintea* Barneby, (G) *Calliandra elegans* Renvoize, (H) *Calliandra sincorana* Harms e (I) *Calliandra mucugeana* Renvoize. (todas as barras são iguais a 50µm)..... 48

Figura III. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Chloroleucon dumosum* (Benth.) GPLewis, (B) *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) GPLewis, (C) *Chloroleucon mangense* (Jacq.) Britton & Rose; (D) *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.; (E) *Hydrochorea corymbosa* (Rich.) Barneby & JWGrimes; (F) *Pithecellobium albicaule* Britton & Rose, (G) *Pithecellobium diversifolium* Benth., (H) *Zygia cauliflora* (Willd.) killip., e (I) *Zapoteca portoricensis* var. *portoricensis* (Jacq.) H.M.Hern (todas as barras são iguais a 50µm)..... 49

Figura IV. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae, do gênero *Inga*: seção *Bourgonia*: (A) *Inga cylindrica* (Vell.) Mart., (B) *Inga pezizifera* Benth., (C) *Inga semialata* Willd. e seção *Inga*: (D) *Inga edulis* Mart., (E) *Inga pilosula* (Rico) J.F.Macbr., (F) *Inga subnuda* Benth., (G) *Inga uruguensis* Hook. & Arn., (H) *Inga vera* subsp. *Affins* (DC.) T.D.Penn., (I) *Inga vera* Willd. (todas as barras são iguais a 50µm)..... 50

Figura V. Políades espécies pertencentes a tribo *Ingeae*, do gênero *Inga*: seção *Pseudinga*: (A) *Inga capitata* Desv de., (B) *Inga dysantha* Benth., (C) *Inga vulpina* Mart. Ex Benth. ; seção *Longiflorae*: (D) *Inga rubiginosa* (Rich) DC., (E) *Inga cayennensis* Benth.; seção *Leptinga*: (F) *Inga flagelliformis* (Vell.) Mart., (G) *Inga sellowiana* Benth.; seção *Tetragonae*: (H) *Inga striata* Benth. e seção *Multijugae*: (I) *Inga thibaudiana* Dc.. (todas as barras são iguais a 50µm)..... 51

Manuscrito III

Figura I. Reconstrução do número cromossômico para as espécies da Tribo Ingeae inferida através do ChromEvol 2.0. Gráficos de pizza representam as probabilidades dos números cromossômicos inferidos, onde os números indicam o número cromossômico haploide que apresentam maior probabilidade; As formas geométricas nos ramos indicam os eventos evolutivos que ocorreram; Quadrado = perda (disploidia descendente); triângulo = perda (disploidia descendente) e círculo = duplicação (poliploidia), representam os dois eventos possíveis de acordo com o modelo evolutivo escolhido, inferido com uma expectativa > 0.5. Os idiogramas a direita indicam o número e posição das bandas CMA⁺. A soma dos eventos individuais e o número total de eventos são explicados na inserção..... 70

LISTA DE TABELAS

Manuscrito I

- Tabela 1.** Lista do número de todos os gêneros e famílias testados com a técnica da sopa meristemática..... 25
- Tabela 2.** Tipos de soluções fixadoras testadas para preparação da técnica da sopa meristemática..... 25
- Tabela 3.** Principais características físicas das substâncias utilizadas nos testes das soluções fixadoras envolvidas na sua volatilidade. Dados em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br>..... 26
- Tabela 4.** Números cromossômicos ($2n$); Número de Bandas CMA/DAPI e Nível de ploidia sugerido das espécies, obtidos com o presente protocolo otimizado..... 26
- Tabela 5.** Principais vantagens e desvantagens observadas para a técnica da sopa meristemática..... 27

Manuscrito II

- Tabela 1.** Lista de espécies da tribo Ingeae utilizadas para caracterização palinológica e seus respectivos número de registro do herbário PEUFR/UFRPE e da Embrapa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária IPA..... 52
- Tabela 2.** Medidas dos tamanhos das políades, número de grãos por políades e padrão da políade das espécies da Tribo Ingeae ocorrentes na região Nordeste do Brasil. Dados de tamanho em μm para as políades..... 54

Manuscrito III

- Tabela 1.** Espécies utilizadas na árvore, com o registro do número cromossômico encontrado na literatura por valores de n , $2n$ e outros citótipo, seguido dos autores. (** = espécies utilizadas como grupo externo), (* = registros de números de bandas CMA+ , dados obtidos na presente pesquisa)..... 71

RESUMO

O clado Mimosoide pertence atualmente a subfamília Caesalpinioideae e família Leguminosae, a qual apresenta aproximadamente 770 gêneros e 19.500 espécies, sendo a terceira maior família das fanerógamas. O objetivo do trabalho foi realizar uma caracterização cromossômica, palinológica e molecular em representantes da tribo Ingeae e situá-los num contexto evolutivo através de uma reconstrução citogenética comparada. Neste trabalho foram analisadas características polínicas de 60 espécies pertencentes a treze gêneros do Clado Mimosoide, e utilizados dados citomoleculares de 54 espécies na reconstrução do número cromossômico ancestral. Para a análise polínica o material floral foi hidratado pela técnica da acetólise, sendo posteriormente mensurados, descritos e fotografados em microscópio óptico. Dados quantitativos foram submetidos a tratamento estatístico descritivo. Para caracterização citogenética e molecular, foram empregadas técnicas de colocação com fluorocromos CMA e DAPI e análise filogenética, com base em marcadores moleculares disponíveis nos bancos de dados públicos, por inferência Bayesiana na qual foi utilizada para reconstrução do número cromossômico ancestral pelo ChromEvol. Na análise polínica confirmou-se a presença de políades entre as espécies variando entre 16, 20, 24, 28 e 32 grãos de pólen constituindo as diferentes unidades de dispersão, resultando em heterogeneidade inter e intragenérica. Foi possível caracterizar e diferenciar muitas das espécies mediante os dados quantitativos e qualitativos pelo número de grãos de pólen por unidade de dispersão, forma, simetria e tamanho das políades. Os dados obtidos serviram para diferenciar e corroborar na classificação da maioria dos diferentes táxons e no estudo da taxonomia desta tribo. A caracterização cromossômica mostrou que o número e o padrão de distribuição das bandas CMA⁺ foram diferentes entre as espécies de *Calliandra* sect. *Androcallis* tendo inclusive mais bandas do que o observado na seção *Microcallis*. Essencialmente na seção *Androcallis* o número de bandas CMA⁺ não esteve associado ao nível de ploidia. Índícios de inversão foram observados em algumas espécies. A reconstrução filogenética indicou que o número cromossômico ancestral para a tribo Ingeae é $n = 13$ e $n = 8$ como número ancestral para o gênero *Calliandra*. O evento citogenético mais frequente foi o ganho cromossômico, porém, constatou-se que a poliploidia foi também um evento muito recorrente para diversificação do grupo.

PALAVRAS-CHAVE: Citogenética Comparada - Clado Mimosoide – Número Básico – Poliades.

ABSTRACT

The Mimosoid clade currently belongs to the subfamily Caesalpinioideae and family Leguminosae (formerly Fabaceae), which presents approximately 770 genera and 19,500 species, being the third largest family of phanerogams. The objective of the work was to perform the chromosomal and palynological characterization of representatives of the Ingeae tribe and situate them in an evolutionary context through a comparative cytogenetic reconstruction. In this work, pollen characteristics of 60 species of thirteen genera of Clad Mimosoid and 54 species in the reconstruction of the ancestral chromosome number were analyzed. For the pollen analysis the floral material was hydrated by the technique of acetolysis, and subsequently measured, described, photomicrographs under an optical microscope (M.O.). Quantitative data were submitted to descriptive statistical treatment. For cytogenetic characterization, placement techniques were used with CMA and DAPI fluorochromes and phylogenetic analysis by Bayesian inference in which it was used to reconstruct the ancestral chromosome number by ChromEvol. In the pollen analysis the presence of pollen agglomerates between the species ranging from 16, 20, 24, 28 and 32 pollen grains constituting the different dispersion units was confirmed, resulting in heterogeneity both among the genera and in the same genus. It was possible to characterize and differentiate many species through quantitative and qualitative data by the number of pollen grains per unit of dispersion, shape, symmetry and size of poles. The data obtained was useful to differentiate and corroborate in the classification of most of the different taxa and in taxonomy studies of this tribe. The chromosomal characterization showed that the number and distribution pattern of the CMA⁺ bands were different among the *Calliandra* species in the Androcallis section, with even more bands than the Microcallis section. Essentially in the Androcallis section the number of CMA⁺ bands was not associated with the level of ploidy. Signs of inversion were observed in some species. Reconstruction indicates that the ancestral chromosome number for the Ingeae tribe is $n = 13$. The *Calliandra* genus presented an ancestral number $n = 8$. The most frequent event was the chromosomal gain, however, the duplication presented the highest net balance of diversification.

Key words: Comparative Cytogenetics – Clado Mimosoid - Basic Number - Polyades.

1. INTRODUÇÃO

A tribo Ingeae Benth. está circunscrita na segunda maior subfamília Cesalpinoide Adams., Mimosoideae (Lewis et al., 2005). Esta subfamília compreende quatro tribos (Mimoseae Bronn., Mimozygantheae Burkart., Acacieae Dumort. e Ingeae Benth.), cerca de 3.270 espécies e 82 gêneros (Lewis et al. 2005), com centros de maior diversidade localizados na América tropical, África, Ásia e Austrália (Elias 1981). No Brasil, é representada por aproximadamente 37 gêneros, dos quais *Mimosa* (ca. 346 spp.) e *Inga* (ca. 129 spp.) são os mais representativos, correspondendo quase 50% dos representantes (Lima et al. 2014).

Muitas espécies da tribo Ingeae são usadas de diversas formas, como ornamentação, fármacos e alimentação. Espécies como as dos gêneros *Cojoba* Britton & Rose, *Falcataria* (Nielsen) Barneby & Grimes, *Macrosamanea* Britton & Killip, *Pithecellobium* Mart. e *Samanea* Merrill., apresentam dentre suas principais características a presença de numerosos estames com filetes unidos em tubo além de frutos com várias adaptações aos diferentes agentes dispersores (Van der Pijl 1972). Estudos sobre o grupo sustentam que suas espécies se limitam a florestas úmidas, sendo muitas delas típicas de florestas secundárias e de terras periodicamente alagadas ou mal drenadas (Barneby 1998).

O número de espécies de Ingeae varia de acordo com o autor, devido à sobreposição de caracteres morfológicos, variabilidades morfológicas; presença de complexos de espécies e a ocorrência des endêmicas. Atualmente são reconhecidos cerca de 36 gêneros e 951 espécies (Lewis; Rico Arce, 2005; Azani et al., 2017).

Muitos cientistas utilizam métodos baseados em sistemática filogenética para entender melhor os processos evolutivos, aprimorando estimativas de biodiversidade e permitindo um melhor estabelecimento de estratégias de conservação das espécies (Lopes; Ho, 2015). A Citogenética é uma ferramenta útil em pesquisas da sistemática e da evolução das plantas, podendo auxiliar os estudos clássicos de taxonomia morfológica compilando dados filogenéticos com intuito de um melhor entendimento da evolução de grupos taxonômicos.

A maioria das análises citogenéticas anteriores em Ingeae é restrita a contagem de cromossomos, com apenas algumas descrições cariomorfológicas e meiose. O grupo apresenta grande variabilidade no número cromossômico, devido a presença de poliploides, podendo ser encontrada espécies com $2n = 16$ até $2n = 104$ em acessos poliploides de espécies do gênero *Albizia* Durazz (CCDB, 2017). No entanto, há ainda uma expressiva carência, envolvendo espécies globalmente. Há registros de dados citogenéticos para apenas 7% das espécies, sendo escassos estudos incluindo análises cariotípicas mais refinadas, com descrições da morfologia cromossômica bem como ausência de registros de bandamento cromossômico.

Com o intuito de dar subsídio a um melhor entendimento sobre as tendências evolutivas e as relações taxonômicas e genéticas de Ingeae, o presente estudo objetivou caracterizar citogeneticamente espécies desta tribo. Assim, foram geradas novas informações em nível citogenético, como número, morfologia e bandejamento cromossômico. Paralelo a isso, foram utilizados marcadores moleculares para construção filogenética dessas espécies e análise citogenética comparativa, para obtenção de uma análise mais precisa dos mecanismos de evolução cariotípica (citofilogenia) do grupo.

2.1 Família Leguminosae Adans.

Leguminosae Adans. é a terceira maior família de plantas com flores, atualmente compreendendo cerca de 19.500 espécies distribuídas em aproximadamente 750 gêneros com distribuição cosmopolita (Lewis et al., 2005). É a principal família no Brasil, com cerca de 210 gêneros e 2.694 espécies (Forzza et al. 2010). Está presente nos diversos ecossistemas no Brasil, em especial na Floresta Atlântica, onde possui elevada representatividade entre os elementos do estrato arbóreo (Lima et al. 2009). É um dos grupos mais economicamente importantes de plantas, depois de Poaceae (Wojciechowski et al., 2004). Muitas de suas espécies são utilizadas para os mais diversos fins: alimentação humana e animal; melhoramento do solo através da fixação de nitrogênio; medicinais, farmacológicos; para fabricação de bebidas e combustível biodiesel; indústria madeireira, para fabricação de móveis, construções de casas e ornamentação (Lewis et al. 2005; Lavin et al., 2005).

Apesar de ser considerada monofilética, as leguminosas apresentam uma taxonomia complexa, com muitos taxa apresentando problemas na delimitação ao nível de gêneros (Bentham 1875; Polhill & Raven, 1981; Polhill 1994). A família tem sido sustentada em diferentes estudos filogenéticos como monofilética baseados em dados morfológicos (Chappil 1995; Tucker & Douglas 1994) e moleculares (Chase et al. 1993; Kass & Wink 1996; Doyle et al. 1997, 2000; Soltis et al. 2000; Kajita et al. 2001; Persson 2001; Wojciechowski et al. 2004, Judd & Olmstead 2004).

Análises moleculares com base no gene plastidial *matK*, realizadas por Wojciechowski et al. (2004), sustentam o monofiletismo das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae (excluindo *Dinizia* Ducke). Caesalpinioideae, se manteve parafilética corroborando estudos anteriores (Bruneau et al 2000, 2001; Herendeen et al. 2003). Sistemáticos de Leguminosae concordam que Mimosoideae divergiu de dentro de Caesalpinioideae, apresentando uma relação irmã com a tribo Caesalpinieae (Elias, 1981; Doyle et al., 1997; Clarke et al., 2000).

Apesar de monofilética, a sistemática de Mimosoideae tem estado em fluxo (Clarke et al., 2000). A subfamília era dividida anteriormente em cinco tribos: Mimoseae Bronn, Mimosygantheae Burkart, Acacieae Dumort, Ingeae Benth., e Parkieae Benth. (Elias, 1981). Esta última agora está incluída em Mimoseae, restando as quatro tribos (Lewis et al., 2005). Baseado em análises filogenéticas moleculares, percebe-se a necessidade de uma revisão completa no sistema tribal de Mimosoideae, sendo as tribos atuais polifiléticas ou parafiléticas (Luckow et al., 2003; Miller, 2008). Ademais, as Mimosoideae apresentam uma baixa taxa de variação nucleotídica para os genes *matK* e *rbcL* (Lavin et al., 2005). Isso pode fundamentar os

grupos fracamente sustentados nas recentes filogenias (Luckow et al. 2003; Miller et al. 2003). Para Lavin et al. (2005), isso ocorre devido à recente diversificação (15- 40Ma) e a extinção de muitas taxa no início do Terciário.

2.1.1 Tribo Ingeae Benth.

A subfamília Mimosoideae apresenta cerca de 3.273 espécies classificadas em 82 gêneros, com distribuição tropical e subtropical, principalmente, em regiões áridas e semi-áridas e temperadas (Lewis et al. 2005). Difere morfologicamente das demais leguminosas por apresentar folhas geralmente bipinadas, corola com prefloração valvar, flores pequenas, actinomorfas, agrupadas em espigas, glomérulos, racemos ou umbelas. Desde 2010, uma síntese da riqueza da subfamília vem sendo elaborada na flora brasileira, até o momento, os dados da Lista das Espécies da Flora do Brasil (Lima et al. 2010) são: 34 gêneros e 760 espécies, dos quais 480 são endêmicas. *Mimosa* L., com 323 espécies (Dutra & Morim 2010), e *Inga* Mill., com 127 espécies (Garcia & Fernandes 2010). Apesar dos avanços nos estudos filogenéticos da subfamília, muitas relações inter e intratribais não estão totalmente esclarecidas, principalmente na falta de um consenso sobre o monofiletismo de vários táxons. As afinidades entre os gêneros da tribo Ingeae ainda necessitam de estudos moleculares mais completos que incluam táxons recentemente descritos ou reintegrados a tribo, e que contemplem espécies, além do auxílio de outras áreas como a citogenética, bioquímica, biogeografia, entre outros.

Das espécies de Mimosoideae, Bentham (1875) definiu e colocou todas as espécies de Mimosoideae com estames numerosos e monadelfos na tribo Ingeae, abrangendo 15 gêneros e 408 espécies. Posteriormente, outros gêneros foram descritos, baseados em caracteres reprodutivos e carpológicos, os quais quando ausentes, dificultava a identificação dos táxons propiciando determinações errôneas. Destes 35 gêneros, Hutchinson (1964) reconheceu apenas 16 e sinonimizou 20 em *Pithecellobium* Mart. Depois disso, diversas alterações genéricas dos táxons neotropicais da tribo Ingeae ocorreram (ver Barneby & Grimes 1996, 1997; Luckow et al. 2003; Lewis et al. 2005). Atualmente a tribo compreende 36 gêneros, sendo 24 exclusivamente neotropicais, com 935 a 966 espécies (Lewis & Rico-Arce 2005).

Ingeae foi dividida em dois grupos com relação ao tipo da folha: um com folhas pinadas, incluindo apenas o gênero *Inga*, e outro com folhas bipinadas, comuns aos demais gêneros (Romero, 2005). As espécies de Ingeae podem ser encontradas em florestas da África, Ásia-Austrália, América Central e por toda a América do Sul. No Brasil, a bacia Amazônica é o maior centro de diversidade da tribo, com *Inga* sendo o gênero mais ocorrente, além disso, Ingeae tem registro em todos os sete biomas brasileiros (Ducke 1943; Lima et al. 2010).

2.2 CITOGÉNÉTICA DA TRIBO INGAE BENTH.

Os estudos citogenéticos em Ingeae se resumem, praticamente, a citogenética clássica, e se baseiam na contagem do número cromossômico e na meiose, e os dados não são para todas as espécies (Tabela 1). Goldblatt, (1981a) indicou como número cromossômico básico para todos os gêneros de Ingeae $x = 13$, exceto para *Calliandra sensu stricto*. Várias espécies distribuídas nas sers. *Nitidae*, *Macrophyllae* e *Racemosae* tendo $n = 8$; *C. calothyrsus* (Goldblatt, 1981 b) e outros membros do ser. *Racemosae* apresentando $n = 11$; e o poliploide *C. pittieri* indicando $n = 16$ (Shibata, 1962).

Para as contagens realizadas até o momento, cerca de 7% de todas as espécies para a tribo, os números cromossômicos variam de $2n = 16$ até $2n = 52$ em acessos poliploides de *Inga mil* (CCDB, 2017). A poliploidia é um fenômeno bastante comum, ocorrendo em espécies como: *Inga laurina* (Sw.) Willd, *Albizia policephala* (Benth.) Killip. Uma melhor caracterização citogenética desses cariótipos poderia ser dada por uma análise baseada em métodos convencionais mais apurada e ampliação no número de espécies, além de bandeamento cromossômico e hibridização *in situ* fluorescente.

Tabela 1 - Número cromossômicos mínimos e máximos registrados para os gêneros da tribo Ingeae. Chromosome Counts Database (CCDB) até 2017.1.

Gêneros	Nº spp.	Nº spp. com contagem cromossômica	n	$2n$
<i>Abarema</i> Pittier	53	1	13	-
<i>Albizia</i> Durazz	149	25	13	26 – 104
<i>Archidendron</i> F. Muell	101	2	-	26
<i>Archidendropis</i> I.C. Nielsen	13	0	-	-
<i>Blanchetiodendron</i> Barneby & Grimes	1	0	-	-
<i>Calliandra</i> Benth.	196	10	8	16 – 32
<i>Cathormion</i> Hassk	5	0	-	-
<i>Cedrelinga</i> Ducke	1	0	-	-
<i>Chloroleucon</i> Benth.	14	1	13	26
<i>Cojoba</i> Britton & Rose	22	0	-	-
<i>Ebenopsis</i> Britton & Rose	3	0	-	-
<i>Enterolobium</i> Mart.	13	4	13	26
<i>Faidherbia</i> A. Chev.	1	1	13	26
<i>Falcataria</i> (I.C. Nielsen) Barneby & J.W. Grimes	3	1	13	26
<i>Guinetia</i> L. Rico & M. Sousa	1	0	-	-
<i>Havardia</i> Small	7	1	13	26
<i>Hesperalbizia</i> Barneby & J. W. Grimes	1	1	13	26
<i>Inga</i> Mill	391	18	13	26 – 52

<i>Leucochloron</i> Barneby & J. W. Grimes	5	0	-	-
<i>Lysiloma</i> Benth.	11	3	13	26
<i>Painteria</i> Britton & Rose	4	0	-	-
<i>Pararchidendron</i> I.C.Nielsen	3	0	-	-
<i>Paraserianthes</i> I.C.Nielsen	4	1	13	26
<i>Pithecellobium</i> Mart.	80	4	13	26
<i>Pseudosamanea</i> Harms	1	0	-	-
<i>Samanea</i> Benth.	5	1	13	26 – 52
<i>Serianthes</i> Benth.	8	0	-	-
<i>Sphinga</i> Barneby & J.W. Grimes	3	1	13	26
<i>Thailentadopsis</i> Kosterm	2	0	-	-
<i>Wallaceodendron</i> Koord	1	1	13	26
<i>Zapoteca</i> H.M. Hern	21	8	13	26
<i>Zygia</i> P. Browne	65	0	-	-
Total	1188	84		

2.2.1 Citogenética comparativa

Nas últimas décadas do século passado, pesquisadores de Botânica sistemática iniciaram estudos com caracteres morfológicos como base de dados para análises cladísticas. Com os avanços da tecnologia envolvendo o DNA e a bioinformática, foi possível aprimorar estas técnicas para o desenvolvimento de árvores filogenéticas. Trabalhos com filogenia e dados morfológicos são bastantes comuns e ajudaram a elucidar problemas taxonômicos.

Chappill (1995) foi o responsável pelo primeiro estudo filogenético na família Leguminosae, usando apenas dados morfológicos. Ao longo da década de 90 foram realizados diversos estudos com caracteres moleculares na família, afim de entender as relações de parentesco (ver Chase et al. 1993; Kass & Wink 1996; Doyle et al. 1997, 2000; Soltis et al. 2000; Kajita et al. 2001; Persson 2001; Wojciechowski et al. 2004, Judd & Olmstead 2004 e Lewis et al., 2005).

Mais recentemente, o uso da filogenia molecular compilado ao uso de dados citogênicos tem se tornado uma fonte de informações evolutivas importantes para entender os grupos de plantas. O número cromossômico é comumente utilizado nas análises citotaxonômicas e pode apontar características plesiomórficas de um grande clado recorrente que surgiu independentemente em distintos clados (homoplasias) ou novidades evolutivas restritas a um clado (sinapomorfia) ou a uma única espécie (autapomorfia). Assim, a interpretação dos caracteres cromossômicos num contexto filogenético através de métodos filogenéticos comparativos foi denominado *citofilogenia* (Guerra, comunicação pessoal; Schultheis, 2001; Hansen et al., 2006; Wood et al., 2009; Mayrose et al., 2010; Cusimano et al., 2012; Glick e Mayrose, 2014).

2.3 UTILIZAÇÃO DA PALINOLOGIA NA CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES NA TRIBO INGEAE BENTH.

A diversidade biológica da Tribo Ingeae é ampla quando comparada com outros grupos taxonômicos, possibilitando a realização de inventários florísticos para a identificação de inúmeras espécies, assim como a realização de estudos voltados a diferenciação entre as mesmas. Desta forma, estudos palinológicos são importantes na busca da caracterização dos diferentes táxons (Buril et al., 2010; Freitas Cruz et al., 2017; Santos & Romão, 2008; Taisma, 2013).

Estudos demonstram existir para a Tribo Ingeae características polínicas em que formam agrupamentos em suas unidades de dispersão que podem ser desde mônades a tétrades ou políades, sendo estas políades compostas por 8, 12, 16 ou 32 grãos de pólen, em que o tipo políade se apresenta como a principal unidade de dispersão de reprodução da espécie (Guinet, 1981).

Além dos atributos numéricos de suas unidades de dispersão, as quais apresentam bastante heterogeneidade, existentes para os diversos táxons da Tribo *Ingeae*, há também a possibilidade da investigação da coleta de dados com finalidade de diferenciar gêneros e espécies ser efetuada com características do tamanho da unidade de dispersão, sua forma, padrão e da ornamentação de sua superfície externa (exina) sendo, portanto, caracteres colaborativos na taxonomia destas e de outras espécies de angiospermas (Barth & Melhem, 1988).

Neste trabalho foi realizado uma adaptação à técnica Air Drying desenvolvida por Carvalho e Saraiva (1993) com intuito de otimizar a produção de lâminas para estudos citogenéticos de maneira mais eficiente e produtiva. Somado a isso, foram obtidos dados palinológicos que auxiliam para a taxonomia do grupo, também foi realizado um estudo das relações evolutivas para espécies da tribo Ingeae Benth., através de uma análise citofilogenética, afim de contribuir para a taxonomia do grupo.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barth, O. M.; Melhem, T.S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Campinas: Editora UNICAMP, 1988. 75 p.
- Buril, M., F. dos Santos & M. Alves. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 24(1): 53-64.
- Forzza, R. C. et al. 2010. Síntese da diversidade brasileira. In: Forzza, R. C. et al. 2010. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. v. 1: 21-42. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Freitas Cruz, P.; Mendonça, C. B. F.; Gonçalves-Esteves, V. Pollen morphology of selected species of tribes Ingeae and Mimoseae (Mimosoideae —Leguminosae) occurring in the Atlantic Forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**. 2017.
- Guinet, PH. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. Pp. 789-799. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (ed.). **Advances in Legume Systematics** – part 2. Kew, Royal Botanic Gardens.
- Hernández, H.M. 1986. Zapoteca: A new genus of neotropical Mimosoideae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 755-763.
- Lavin, M., Herendeen, P.S., Wojciechowski, M.F., 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst. Biol.* 54, 575–594.
- Lewis, G.P., Schrire, B., MacKinder, B., Lock, M., 2005. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Polhill, R.M., Raven, P.H., 1981. *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Santos, F. A. R.; Romão, C. O. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (*Leguminosae - Mimosoideae*) from Bahia, Brazil. **Grana**. v. 47, pp. 101-116, 2008.
- Taisma, M. A. 2013. Caracterización de Políades en Especies Venezolanas del Género *Inga* Mill. (FABACEAE-MIMOSOIDEAE). **Acta Botánica Venezolánica**. 36 (1): 1-14.
- Wojciechowski, M. F.; LAVIN, M. & Sanderson, M. J. 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many wellsupported subclades within the family. *American Journal of Botany* v. 91(11):1846-1862

MANUSCRITO I

“Sopa Meristemática”: Adaptação de técnicas citogenéticas para preparação de lâminas cromossômicas de alta qualidade em espécies vegetais

Artigo a ser enviado ao periódico:
Biotechniques

Fator de impacto: 2.098
ISSN: 0736-6205

“Sopa Meristemática”: Adaptação de técnicas citogenéticas para preparação de lâminas cromossômicas de alta qualidade em *Inga* e outras espécies vegetais

Genialdo Ramos dos Santos¹, Maria Angélica Oliveira Marinho¹, Vanessa Emanuelle de Oliveira Maciel², e Reginaldo de Carvalho^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

³**Autor para correspondência:** reginaldo.ufrpe@gmail.com

RESUMO

Este artigo desenvolveu uma metodologia simplificada, de baixo custo e elevada produtividade quanto a preparação de lâminas citogenéticas. Inicialmente desenvolvida e ajustada para o gênero *Inga*, a técnica se mostrou eficiente para diversas outras espécies de angiospermas, onde a partir de tecidos meristemáticos radiculares combinados com a metodologia desenvolvida, os resultados com coloração convencional e CMA/DAPI foram apresentados com bastante êxito.

Palavra-Chave: Air Drying – Citogenética Vegetal - SteamDrop.

INTRODUÇÃO

As dificuldades existentes na preparação cromossômica para as análises citogenéticas principalmente em vegetais, requer a utilização de protocolos mais eficientes e capazes de proporcionar resultados satisfatórios que garantam uma boa observação, avaliação e descrição dos cromossomos de um determinado organismo. Ter um protocolo eficiente é um passo fundamental para todas e quaisquer técnicas citogenéticas, uma vez que cromossomos bem espalhados e morfológicamente intactos garantem uma análise mais confiável. Diversas técnicas de preparação cromossômicas em plantas foram adaptadas a partir das preparações desenvolvidas para animais ao longo dos anos, e se tratando de cromossomos de plantas, a presença da parede celular e o tipo de cariótipo número e tamanho dos cromossomos são as maiores dificuldades encontradas (CARVALHO; SARAIVA, 1993; GUERRA; SOUZA, 2002; MURATA, 1983; PIJNACKER; FERWERDA, 1984; RAYBURN; GOLG, 1982; SCHULZ-SCHAEFFER, 1980). Há três métodos principais de preparação cromossômica em plantas: esmagamento (squashing), espalhamento (Air Drying) e gotejamento (SteamDrop) (KIROV et al., 2014).

A técnica de esmagamento (BELLING, 1921; GUERRA; SOUZA, 2002; SCHULZ-SCHAEFFER, 1980) é umas das mais utilizadas até os dias atuais por diversos pesquisadores da área devido a facilidade de aplicação e por ter sido esta a primeira metodologia utilizada para estudos citogenéticos em plantas. As variações subsequentes desta, alteração concentrações e tipos de corates, mas não o procedimento em si. Outras técnicas desenvolvidas posteriormente foram criadas com intuito de corar diferencialmente e longitudinalmente partes específicas dos cromossomos (bandeamentos), porém muitas vezes utilizam o mesmo procedimento da técnica de esmagamento. A técnica de esmagamento amplamente utilizada, acarreta problemas na qualidade do material citogenético, como perda ou fragmentação de cromossomos, durante o processo de esmagamento ou durante a remoção da lamínula a baixas temperaturas de N₂ e ruptura da parede celular devido a pressão aplicada de forma inadequada (RAYBURN; GOLG, 1982, PHILLIPS; WANG, 1984). Além disso, muitas vezes há dificuldade de espalhar os cromossomos no mesmo plano de foco devido ao grande acúmulo de células e tecidos residuais durante o procedimento (GOULD, 1984). A técnica de secagem ao ar foi desenvolvida primeiramente por Rothfels; Siminovitch (1958), resultando em avanços na citogenética de mamíferos e humanos. Mais tarde, pesquisadores (CARVALHO; SARAIVA, 1993; MURATA, 1983; PIJNACKER; FERWERDA, 1984; RAYBURN; GOLG, 1982) apontaram a importância de adaptar esta técnica para materiais vegetais. Este método é mais apropriado para as plantas com pequenos cromossomos (KIROV et al., 2014). A técnica da gotejamento seguida da evaporação natural da porção líquida tem a vantagem de apresentar um bom espalhamento

dos cromossomos, contudo, apresenta um índice muito baixo de metáfases devido a perda de células durante o processo de separação, além de danos sob tratamento hipotônico (AMBROS; MATZKE; MATZKE, 1986; ANAMTHWAT-JÓNSSON, 2003; ANDRAS et al., 1999; CARVALHO; SARAIVA, 1993; GEBER; SCHWEIZER, 1988; KATO et al., 2006; KATO; LAMB; BIRCHLER, 2004; KIROV et al., 2014; MOURAS et al., 1987; MOURAS; SALESSES; LUTZ, 1978; MURATA, 1983; KIROV et al., 2014).

Sabe-se que a produção de lâminas citogenéticas de plantas demanda muito tempo e já foi considerado um trabalho “artesanal” por exigir muito cuidado e delicadeza na sua preparação. Além disso, os diversos métodos devem ser testados para cada tipo vegetal estudado devido as particularidades da espécie e da técnica escolhida. No geral, o preparo de células metafásicas mitóticas depende de três fases importantes: 1. Pré-tratamento - bloqueio das células até a fase de metáfase com um antimitótico, impedindo a formação do fuso acromático, por dissolução da tubulina, permitindo um maior espalhamento dos cromossomos; 2. Fixação - as células são fixadas em solução Carnoy (3:1 v/v álcool: ácido acético), para eliminar restos celulares e citoplasmáticos; 3. Espalhamento cromossômico, que pode ser de diversos métodos (SHARMA; SHARMA, 1980). Este passo é crucial porque permite que os cromossomos fiquem suficientemente separados na lâmina, para uma boa visualização e suficientemente próximos, para não haver mistura de cromossomos de células contíguas. Após a preparação da lâmina a Técnica de Coloração a ser empregada irá depender do estudo a ser realizado e do tipo de informação buscada.

A maioria dos procedimentos para a obtenção desses cromossomos geralmente são técnicas trabalhosas que, muitas vezes, dispendem de tempo e envolvem materiais de custo elevados como gelo seco ou nitrogênio líquido. Portanto, as alterações propostas para o protocolo otimizado e com base nos resultados obtidos constitui o objetivo principal deste trabalho, onde há adaptações as técnicas citogenéticas de Air Drying e Steam Drop com intuito de otimizar/simplificar o preparo de lâminas para estudos citogenéticos em plantas, reduzindo o tempo na bancada e custos com reagentes, ao mesmo tempo em que aumenta o número de lâminas com excelente espalhamento dos cromossomos tanto para representantes do gênero *Inga* como para outras espécies aqui estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os passos básicos na confecção de lâminas citogenéticas em plantas, normalmente na fase de metáfase mitótica, incluem pré-tratamento, fixação, maceração, espalhamento e coloração. Abaixo, estes passos são indicados por numerais romanos.

Material Vegetal

Meristemas radiculares de tamanhos variados foram colhidos a partir de sementes, plântulas e/ou estacas de 49 espécies pertencentes a 21 gêneros. A escolha foi baseada nas características de tamanho dos cromossomos, variações da heterocromatina e níveis de ploidias (Tabela 1).

Pré-tratamento

Todas as espécies foram pré-tratadas com 1mL do antimetabólito 8HQ (8-hidroxiquinoleína 0,002M), 1ml para cada tubo Eppendorff (1,5 mL), tampados e colocados a temperatura de aproximadamente 17°C, por tempo variando entre três e cinco horas, dependendo da característica de cada espécie (Tabela 2).

Fixação do Material

Foram testados quatro tipos de soluções de fixação entre etanol, metanol, clorofórmio e ácido acético (Tabela 2). Após o pré-tratamento, as raízes foram transferidas para tubos Eppendorff (1,5 mL) contendo solução fixadora (metanol + ácido acético) 3:1v/v e mantidos a temperatura ambiente por cerca de uma hora. Após este procedimento a solução foi trocada por uma nova solução fixadora de mesma concentração e mantida a temperatura ambiente por no mínimo seis horas, posteriormente foram armazenadas em freezer a -20°C, até o momento da preparação das lâminas.

Preparação “sopa meristemática” por digestão enzimática

A mistura de enzima estoque, Celulase Onozuka R-10 (*Trichoderma viride*) 2% e Pectinase Sigma-Aldrich (*Aspergillus niger*) 20%, foi preparado em tampão cítrico 0,1 M (pH4.8). As concentrações da mistura de incubação e tempo de trabalho da enzima para as diferentes espécies foram em média 2h e 30 min. Este tempo foi ultrapassado quando as raízes eram muito grossas.

A preparação da “sopa meristemática” por digestão enzimática seguiu os seguintes passos:

- I. Lavagem das raízes fixadas em água destilada durante 10-30 min.;
- II. Isolamento da parte contendo o meristema radicular com auxílio de bisturi; e transferência para tubo Eppendorff. Cada tubo recebeu cerca de cinco meristemas;
- III. Adição da solução enzimática (Celulase 2%:Pectinase 20%) o suficiente para cobrir o material;
- IV. Incubação do material em estufa a 37°C por no mínimo 2h e 30min;

- V. Remoção do excesso de enzima cuidadosamente com auxílio de uma pipeta monocanal;
- VI. Adição de 50µL da mesma solução fixadora preparada na hora, para diluir o restante da enzima presente no material;
- VII. Remoção do excesso de fixador cuidadosamente com uma pipeta;
- VIII. Adição de 100µL da mesma solução fixadora para o eppendorff, mantido devidamente fechado;
- IX. Em seguida os tubos com meristemas foram levados para o agitador (Vortex) para obter dissociação celular, transformando as raízes em uma sopa de células meristemáticas.

Preparação das lâminas pela técnica da “Sopa Meristemática”

Para o preparo das lâminas, foi adaptada a metodologia descrita por Carvalho e Saraiva (1993), com o diferencial da sopa meristemática.

- I. Colocar 10µL da sopa meristemática, com o auxílio de uma pipeta, em cada lâmina, o número de lâminas dependerá da quantidade de solução no Eppendorff;
- II. Mergulhar as lâminas em solução de Ácido acético 45% e remover rapidamente, cerca de 2 segs.;
- III. Secar completamente, de preferência numa estufa a cerca de 55°C, o que leva em torno de 10 a 15 min.

Coloração CMA/DAPI

A coloração CMA/DAPI seguiu o protocolo descrito por (GUERRA; SOUZA, 2002) com pequenas adaptações.

- I. Reservar as lâminas recém-confeccionadas por no mínimo 48 horas;
- II. Adicionar 7µL de DAPI (1µg /mL) sobre a área da lâmina contendo o material;
- III. Cobrir com uma lamínula (de preferência 18x18mm), lembrando de manter a lâmina no escuro por 30 min.;
- IV. Remover a lamínula com um jato de água destilada;
- V. Secar com jato de ar;
- VI. Adicionar 7 µL de CMA (1µg /ml);
- VII. Cobrir com uma lamínula (de preferência 18x18mm), lembrando de manter a lâmina no escuro por 1h;
- VIII. Remover a lamínula com um jato de água destilada;
- IX. Secar com jato de ar;

- X. Adicionar 10µl de meio de montagem glicerol/McIlvaine pH 7,0, contendo 2,5 mM de MgCl₂ (1:1, v/v);
- XI. Cobrir com uma lamínula de tamanho maior que a escolhida para corar (usamos 20x20mm), lembrando de manter a lâmina guardada no escuro.

Obs. As lâminas coradas com estes fluorocromos devem ser armazenadas ao abrigo da luz por no mínimo 48 horas antes de serem analisadas ao microscópio, para que haja estabilidade destes corantes com os cromossomos.

Fotodocumentação

As melhores células foram fotografadas com câmera digital DC 345FX acoplada a um microscópio Leica DM2500. Os comandos de brilho e contraste foram melhorados no programa Adobe Photoshop CS5. Para a contagem dos cromossomos foram analisadas um número mínimo de cinco células.

RESULTADOS

Este artigo descreve um procedimento que ignora a necessidade de esmagamento e remoção de lamínula e o uso de nitrogênio líquido, o que comumente é utilizado na maioria dos protocolos para preparação de lâminas na citogenética vegetal. Este método foi baseado em técnicas como arrasto com secagem ao ar e gotejamento. A adaptação dessas técnicas gerou figuras mitóticas de alta qualidade para prometáfase e metáfase (Fig. I). Os cromossomos foram bem separados, o que facilitou a contagem, além de apresentar uma morfologia bem preservada, com as constrições primárias e secundárias ficando evidentes e as bordas claramente delimitadas, inclusive em cariótipo pequeno (Fig. II, G). Percebe-se, ainda, um fundo citoplasmático limpo e sem resíduos, além de cromossomos no mesmo plano de foco. Uma lista das principais vantagens e desvantagens encontra-se na Tabela 5.

Os cromossomos apresentaram um alto contraste com a coloração CMA/DAPI (Figura II) permitindo fazer uma contagem do número cromossômico e das bandas com alta precisão (Tabela 4). A diversidade cariotípica não foi um empecilho para a técnica da sopa meristemática. Cromossomos grandes, pequenos, bimodais, com grande ou baixo número cromossômico, presença de muita ou pouca heterocromatina, estão bem representados nas figuras II. A técnica da sopa meristemática se mostrou bastante promissora ao ser utilizada em diferentes gêneros pertencentes a várias famílias a qual apresentou resultados satisfatórios e potencial de aplicabilidade para diversas espécies vegetais (Tabela 1). Não sendo necessário mostrar as células de todas as espécies testadas, pois replicariam as diversidades cromossômicas demonstradas aqui.

A solução fixadora com o melhor efeito no espalhamento dos cromossomos e com alto índice mitótico foi o de número 3 (Tab. 2 e 3) elaborado com metanol e ácido acético (3:1), isso pode ser explicado com base nas suas propriedades físicas de dilatação da solução. Mudanças no comprimento dos cromossomos não foram observadas analogamente a outras técnicas. O efeito deste fixador na preparação das lâminas por sopa meristemática pode ser visualizado na Figura I.

DISCUSSÃO

A metodologia proposta possibilitou inicialmente a análise dos cariótipos de espécies do gênero *Inga*, o que demonstrou diferenças cromossômicas numéricas e estruturais. Estas variações cromossômicas são também relatadas na literatura para as espécies deste gênero aqui estudadas (HANSON, 1995).

Os cromossomos do gênero *Inga* são normalmente muito pequenos e com número cromossômico que pode variar de poucos a muitos ($2n = 26$ e 52) dificultando a preparação das amostras a serem analisadas. Dessa forma, ao desenvolvermos um procedimento em laboratório capaz de preparar cerca de 50 lâminas, ou mais, usual para diversas espécies em até 3 minutos, com o uso da sopa meristemática, alcançamos uma maior amplitude dos resultados esperados. Com essa técnica, o tempo do pesquisador é otimizado na etapa de confecção das lâminas. Ajustes no tempo do tratamento enzimático foram, as vezes, necessários para diferentes espécies, devido ao tamanho das raízes, textura e quantidade de células meristemáticas. Uma orientação é cortar o meristema quando este for muito grande. Em média, o tempo mínimo na enzima para todas as espécies testadas foi de 2h e 30 min. Apesar de existir a possibilidade dos cromossomos serem danificados pelo tratamento enzimático, devido à atividade de nuclease / protease (MURATA, 1983), testes com enzima em câmara úmida acondicionada na geladeira de um dia para o outro (cerca de 24h) obtiveram resultados similares e com dissociação celular mais rápida. Segundo (EVANS; COCKING, 1977), esta atividade da enzima é influenciada pelas características osmóticas da solução enzimática.

O sucesso do procedimento depende principalmente de dois fatores, a saber, um pré-tratamento perfeito e a fixação do material, pois as demais etapas são simples. No geral, podem-se obter lâminas com células com núcleos interfásicos, em prófase, em prometáfase e metáfases completas e destas pelo menos metade são bem espalhadas com apenas um ou alguns cromossomos sobrepostos. A obtenção de células livres e intactas só foi possível devido a etapa do Vórtex (item 2.4, IX), na qual ocorre o desprendimento das células por vibração. As células em suspensão asseguram tanto a dispersão adequada de metáfases (isto é, poucas células

sobrepostas nas lâminas) quanto uma boa propagação de cromossomos individuais dentro de uma célula (RAYBURN; GOLG, 1982).

Sabe-se que o ajuste das fases da divisão cromossômica está relacionado ao inibidor mitótico usado, neste caso foi o 8-hidroxiquinolina durante 2-6 horas, podendo mudar o resultado, com base na concentração do inibidor, no tempo de tratamento ou ambos (RAYBURN; GOLG, 1982). Infelizmente, um protocolo de pré-tratamento não é universal e por isso não pode ser usado para todos os organismos. Neste caso, os protocolos de pré-tratamento devem ser otimizados para cada grupo, caso não funcione com o sugerido aqui.

Para fixação de cromossomos metafásicos mitóticos, geralmente é suficiente apenas álcool e ácido acético. O efeito no espalhamento dos cromossomos com o fixador elaborado com metanol pode ser explicado principalmente com base na sua volatilidade, que é a simples relação das pressões de vapor (PV) e da Densidade de Vapor (DV) das substâncias na mistura. A volatilidade está relacionada à facilidade da substância de vaporizar-se, ou seja, passar do estado líquido ao estado de vapor, já a PV é uma medida da tendência de evaporação de um líquido (FELTRE, 2005; MACHADO; MORTIMER, 2005). O metanol apresenta maior PV e menor DV em relação ao etanol, proporcionando uma maior volatilidade e maior área de dissipação, estimulando o espalhamento cromossômico. Apesar de o clorofórmio apresentar maior volatilidade, ele é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na extração do DNA, (ver por exemplo DOYLE; DOYLE, 1987) , por isso não foi possível obter um ótimo resultado quando testado.

Depois da evaporação do metanol, as lâminas são mergulhadas em ácido acético 45% (item 2.5, II), proporcionando: (1) a reidratação da célula; (2) a retirada de resíduos remanescentes nas lâminas; (3) facilitação do espalhamento das células; e (4) limpeza e clareamento do citoplasma. O tratamento com ácido acético 45% não pode ser demorado, pois apesar de remover contaminantes celulares, danifica significativamente as estruturas cromossômicas (SUGIYAMA et al., 2004). A etapa de aquecimento na estufa provavelmente permite melhorar o espalhamento cromossômico, e fixá-los à lâmina. Assim, as células mantêm suas posições.

Dentre outros benefícios do procedimento estão a possibilidade de armazenar as lâminas por tempo indefinido, aplicar técnicas de coloração diferencial para exibição de bandas cromossômicas, e a preparação de lâminas permanentes. O padrão de bandas CMA/DAPI obtido com a técnica da sopa meristemática mostrou-se semelhante ao alcançado em espécies já relatadas anteriormente com o uso de outras técnicas. Sendo o maior diferencial a praticidade e o baixo custo.

CONCLUSÃO

As informações obtidas aqui levaram ao aprimoramento de técnicas anteriores, como de Air Drying e SteamDrop, para otimizar o estudo cromossômico em *Inga*. A eficácia do método permitiu o desenvolvimento da “sopa meristemática” para espécies de outras 11 famílias de plantas, com preparação de lâminas citogenéticas de alta qualidade para diversos tipos de cariótipos e que podem ser tratados e / ou corados para produzir padrões de bandas diferenciais. Em regra, basta dizer que as concentrações, tempos, temperaturas, no geral, toda a metodologia sugerida aqui, foi empiricamente ótima para a preparação cromossômica, a partir do meristema radicular, das 49 espécies de 21 gêneros testados.

As vantagens e distinções do nosso método da "sopa meristemática" em relação aos métodos anteriormente desenvolvidos são: (1) não há necessidade de esmagamento e remoção de lamínula com gelo seco ou nitrogênio; (2) não há quebra da membrana plasmática antes da fixação à lâmina; (3) as células são pré-amolecidas e dissociadas uma das outras, sem sua ruptura; (4) o fixador com metanol espalha as células e cromossomos nas lâminas; (5) lavagem com ácido acético permite limpar o citoplasma e, em parte, separar as células e espalhar os cromossomos; (6) procedimento prático e de baixo custo com resultados garantindo bom contraste e definição de cromossomos; (7) pouco tempo para produção de lâminas em grande quantidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROS, P. F.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. **Chromosoma**, v. 94, n. 1, p. 11–18, 1986.
- ANAMTHWAT-JÓNSSON, K. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. **Methods in Cell Science**, v. 25, n. 3–4, p. 91–95, 2003.
- ANDRAS, S. C. et al. A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. **Chromosome Research**, v. 7, n. 8, p. 641–647, 1999.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017.
- BELLING, J. On counting chromosomes in pollen-mother cells. **American Naturalist**, v. 55, n. 641, p. 573–574 ST–On counting chromosomes in pollen–mo, 1921.
- BRUNEAU, A. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2013.

- CARVALHO, C. R. DE; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142–145, 1993.
- COSTA, L. et al. Comparative cytomelecular analyses reveal karyotype variability related to biogeographic and species richness patterns in Bombacoideae (Malvaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, n. 9, p. 1131–1144, 2017.
- DARRIBA, D. et al. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DE SOUZA, É. R. et al. Phylogeny of Calliandra (Leguminosae: Mimosoideae) based on nuclear and plastid molecular markers. **Taxon**, v. 62, n. 6, p. 1200–1219, 2013.
- DOYLE, J. D.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 19, p. 11–15, 1987.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- ESCUADERO, M. et al. Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploid changes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- EVANS, P. K.; COCKING, E. C. Isolated plant protoplasts. In: STREET, H. E. (Ed.). . **Plant Tissue and Cell Culture**. 2. ed. Berkeley: Univ. of Calif. Press, 1977. p. 101–135.
- FELTRE, R. **Química volume 2**. 6. ed. São Paulo: Moderna, 2005.
- GARSMEUR, O. et al. Two evolutionarily distinct classes of paleopolyploidy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 2, p. 448–454, 2014.
- GEBER, G.; SCHWEIZER, D. Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. **Plant Systematics and Evolution**, v. 158, n. 2–4, p. 97–106, 1988.
- GLICK, L.; MAYROSE, I. ChromEvol: Assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 7, p. 1914–1922, 2014.
- GOULD, A. R. Staining and nuclear cytology of cultured cells. In: VASIL, I. K. (Ed.). . **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 5p. 698–711.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. DE. **Como observar cromossomos: Animal e Humana**. 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.
- HANSON, L. Some new chromosome counts in the genus *Inga* (Leguminosae : Mimosoideae). **Kew Bulletin**, v. 50, n. 4, p. 801–804, 1995.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees.

- Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.
- KATO, A. et al. Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 81, n. 2–3, p. 71–78, 2006.
- KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 37, p. 13554–13559, 2004.
- KIROV, I. et al. An easy “steamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.
- LEWIS, G. P.; RICO ARCE, L. Tribe Ingeae. In: LEWIS, G. et al. (Eds.). **Legumes of the World**. i ed. [s.l.] Royal Botanic Gardens, 2005. p. 193–213.
- MACHADO, A. H.; MORTIMER, E. F. **Qímica**. São Paulo: Scipione, 2005.
- MANDAKOVA, T.; LYSAK, M. A. Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). **the Plant Cell Online**, v. 20, n. 10, p. 2559–2570, 2008.
- MANDÁKOVÁ, T.; LYSAK, M. A. Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 42, p. 55–65, 2018.
- MOURAS, A. et al. Localization by in situ hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 207, n. 2–3, p. 204–209, 1987.
- MOURAS, A.; SALESSES, G.; LUTZ, A. Sur L’Utilisation des Protoplastes en Cytologie: Amelioration D’Une Methode Recente en vue de L’Identification des Chromosomes Mitotiques des Genres *Nicotiana* et *Prunus*. **Caryologia**, v. 31, n. 1, p. 117–127, 1978.
- MURATA, M. Staining air dried protoplasts for study of plant chromosomes. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 58, n. 2, p. 101–106, 1983.
- PHILLIPS, R. L.; WANG, A. S. Chromosome analysis. In: K., V. . I. (Ed.). **Cell Culture and Somatic Cell Cenetfcs of Plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 1p. 712–727.
- PIJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A. Giemsa C-banding of potato chromosomes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, n. 4, p. 415–419, 1984.
- PUTTICK, M. N.; CLARK, J.; DONOGHUE, P. C. J. Size is not everything: Rates of genome size evolution, not C-value, correlate with speciation in angiosperms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1820, 2015.
- RAYBURN, A. L.; GOLG, J. R. A procedure for obtaining mitotic chromosomes from maize. **Maydica**, v. 27, n. January 1982, p. 113–121, 1982.
- ROTHFELS, K. H.; SIMINOVITCH, L. AN AIR-DRYING TECHNIQUE FOR FLATTENING CHROMOSSOMES IN MAMMALIAN CELLS GROWN IN VITRO.

- Stain Technology**, v. 33, n. 2, p. 73–77, 1958.
- SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics: Plants, Animals, Humans**. New York: Springer-Verlag, 1980.
- SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Chromosome Techniques: Theory and Practice**. 3. ed. London: The Butterworth Group, 1980.
- SOUZA, G. et al. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 157–166, 2016.
- SUGIYAMA, S. et al. Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 324, n. 1, p. 39–44, 2004.

APÊNDICES

Tabelas

Tabela 1 – Lista do número de todos os gêneros e famílias testados com a técnica da sopa meristemática.

Família	Gênero	Nº de Espécies
Apocynaceae		
	<i>Hancornia</i> Gomes.	1
Fabaceae		
	<i>Calliandra</i> Benth.	14
	<i>Inga</i> Mill.	4
	<i>Hymenaea</i> L.	1
Cannaceae		
	<i>Canna</i> L.	1
Cucurbitaceae		
	<i>Citrullus</i> Schrad. Ex Eckl. & Zeyh.	1
	<i>Cucumis</i> L.	2
	<i>Lagenaria</i> Ser.	1
	<i>Luffa</i> Mill.	1
Apiaceae		
	<i>Eryngium</i> L.	1
Convolvulaceae		
	<i>Ipomoea</i> L.	2
	<i>Merremia</i> Dennst. ex Enddill.	2
Euphorbiaceae		
	<i>Jatropha</i> L.	1
	<i>Manihot</i> Mill.	9
Cactaceae		
	<i>Melocactus</i> Link & Otto.	1
Asparagaceae		
	<i>Sansevieria</i> Thumb.	1
	<i>Agave</i> L.	1
Malvaceae		
	<i>Abelmoschus</i> Medk.	1
Xanthorrhoeaceae		
	<i>Aloe</i> L.	1
Bignoniaceae		
	<i>Tabebuia</i> Gomes ex DC.	2
	<i>Handroanthus</i> Mattos.	1
Total	12	21
		49

Tabela 2 - Tipos de soluções fixadoras testadas para preparação da técnica da sopa meristemática.

Tipos de fixador	Materiais				Proporção	Resultado
	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Ácido Acético		
Fixador 1	X			X	(3:1)	Ruim
Fixador 2	X		X	X	(3:1:1)	Ruim
Fixador 3		X		X	(3:1)	Ótimo
Fixador 4		X	X	X	(3:1:1)	Ruim

Tabela 3 - Principais características físicas das substâncias utilizadas nos testes das soluções fixadoras, envolvidas na sua volatilidade. Dados em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br>

Características	Densidade de Vapor (ar=1)	Pressão de Vapor (mm Hg)
Metanol	1,1 g/cm ³	100 mmHg A 21,2 °C
Etanol	1,6 g/cm ³	60 mmHg A 26 °C
Clorofórmio	4,1 g/cm ³	200 mm Hg A 25,9 °C
Ácido acético	Não Pertinente	20 mm Hg A 29,9°C

Tabela 4 - Números cromossômicos (2n); Número de bandas CMA/DAPI; Nível de ploidia sugerido de espécies, obtidos com o presente protocolo otimizado.

ESPÉCIE	2n	Nº de bandas CMA/DAPI	Nível de ploidia
<i>Calliandra depauperata</i> Benth.	32	4 CMA+/DAPI-	4x
<i>Calliandra ulei</i> Harms	16	6 CMA+/DAPI-	2x
<i>Canna indica</i> L.	18	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Citrullus lanatus</i> (Thumb.) Matsum. & Nakai.	22	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Eringium foetidum</i> L.	16	2 CMA+/DAPI-	2x
<i>Cucumis anguria</i> L.	24	4 CMA+/ DAPI-	2x
<i>Cucumis melo</i> L.	24	4 CMA+/ DAPI-	2x
<i>Ipomoea bahiensis</i> Willd. Ex Roem. & Schult.	30	6 CMA+/DAPI-	2x
<i>Ipomoea hederifolia</i> L.	30	12 CMA+/DAPI-	2x
<i>Jatropha</i> sp.	22	2 CMA+/ DAPI-	2x
<i>Lagenaria vulgaris</i> Ser.	22	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M. Roem.	26	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Melocactus zehntneri</i> (Britton & Rose) Luetzelb.	44	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Merremia aegyptia</i> (L.) Urb.	30	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Merremia cissoides</i> (Lam.) Hallier F.	30	10 CMA+/DAPI-	2x
<i>Manihot esculenta</i> Crantz.	36	6 CMA+/DAPI-	2x
<i>Manihot reflexifolia</i> P. Carvalho & M. Martins	36	10 CMA+/DAPI-	2x
<i>Sansevieria trifascia</i> Prain.	40	4 CMA+/DAPI-	2x
<i>Manihot reniformis</i> Pohl.	36	10 CMA+/DAPI-	2x
<i>Inga capitata</i> Desv.	52	4 CMA+/DAPI-	4x
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willdd.	26	2 CMA+/ DAPI-	2x
<i>Inga ingoides</i> (Rich).	26	2 CMA+/ DAPI-	2x
<i>Inga striata</i> Benth.	26	2 CMA+/ DAPI-	2x

Tabela 5 – Principais vantagens e desvantagens observadas para a técnica da sopa meristemática.

Vantagens	Desvantagens
Eliminação do esmagamento e remoção da lamínula	Necessita de um bom pré-tratamento e fixação
Rapidez na confecção das lâminas	A fixação deve ser com metanol e ácido acético preparados na hora
Não necessita de grande quantidade de material (meristema)	O metanol pode ser perigoso se ingerido, se em contato com a pele ou inalado
Melhor aproveitamento de células em metáfase	

Figuras

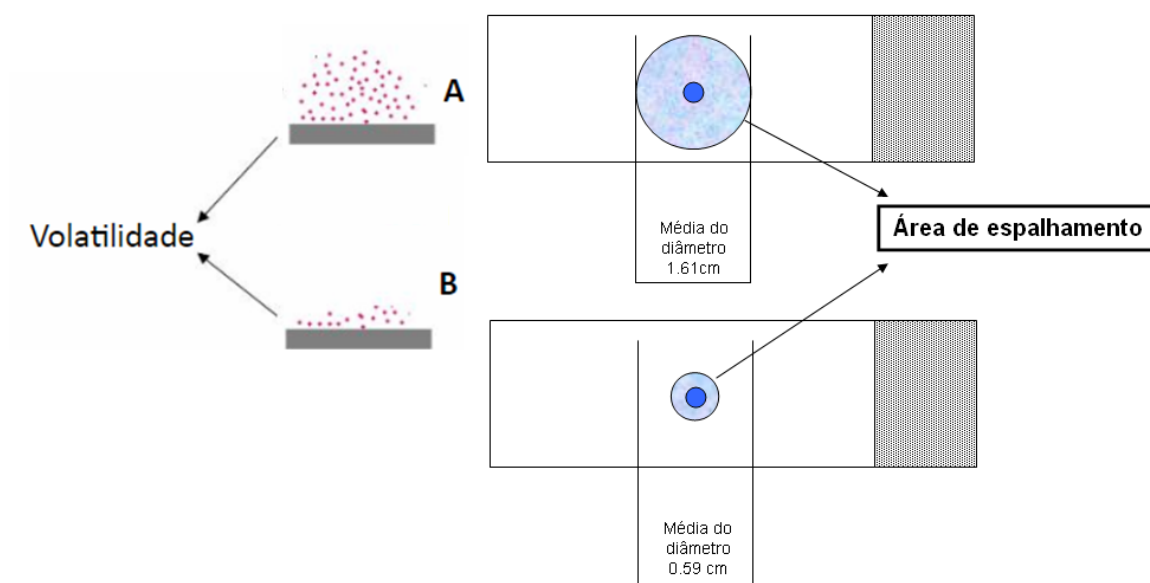


Figura I - Figura esquemática do espalhamento da sopa meristemática na lâmina e sua volatilidade no tempo médio de cinco segundos. A- Solução fixadora com Metanol/Ácido acético 3:1(v/v) e B- Solução fixadora com Etanol/Ácido acético 3:1 (v/v).

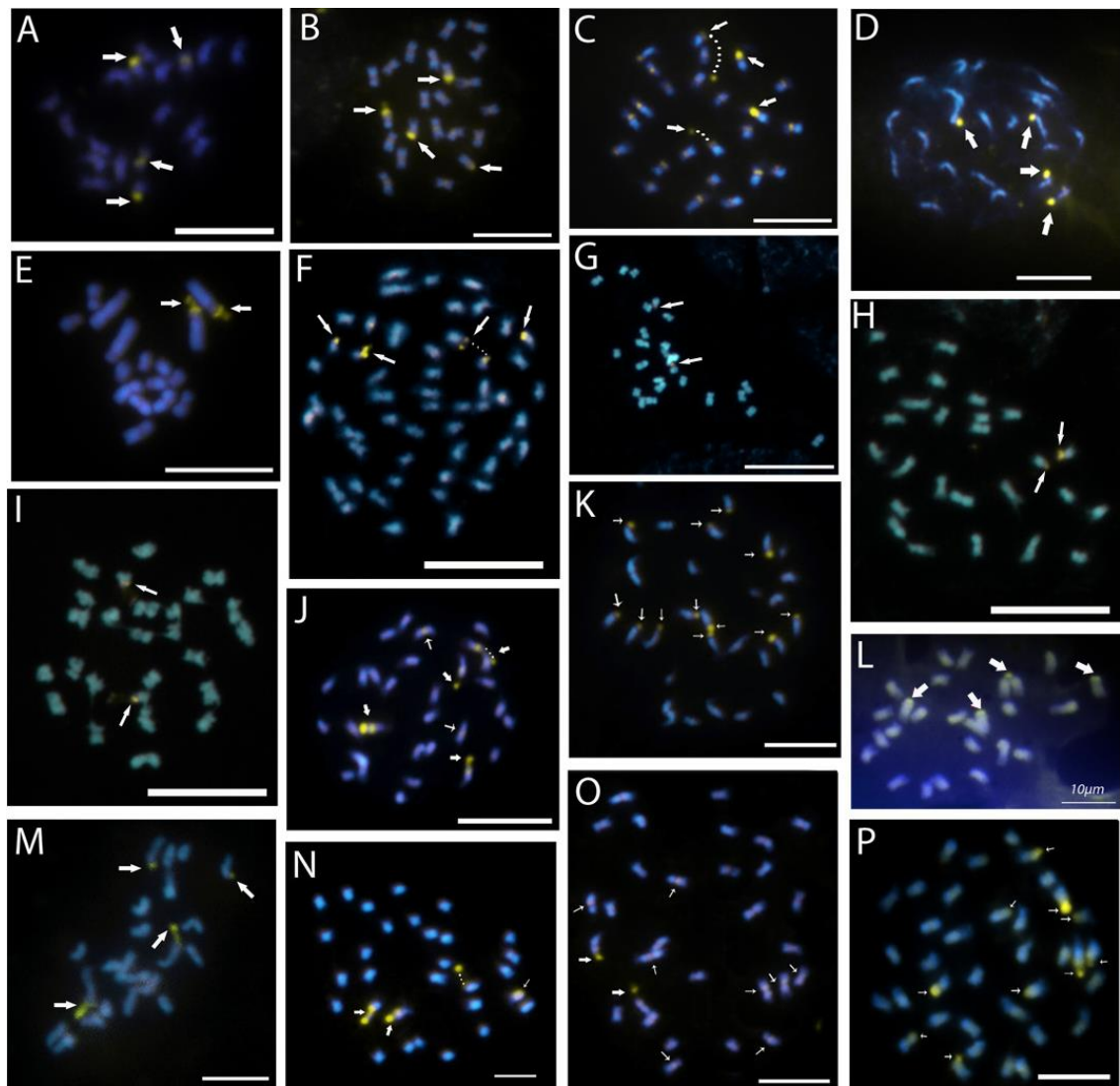


Figura II - Células metafásicas coradas com CMA (amarelo) / DAPI (azul). A - *Canna indica*, $2n = 18$; B - *Citrullus lanatus*, $2n = 22$; C - *Cucumis melo*, $2n = 24$; D - *Cucumis anguria*, $2n = 24$; E - *Eringium foetidum*, $2n = 16$; F - *Inga capitata*, $2n = 52$; G - *Inga laurina*, $2n = 26$; H - *Inga ingoides*, $2n = 26$; I - *Inga striata*, $2n = 26$; J - *Ipomoea bahiensis*, $2n = 30$; K - *Ipomoea hederifolia*, $2n = 30$; L - *Luffa Cylindrica*, $2n = 26$; M - *Lagenaria vulgaris*, $2n = 22$; N - *Merremia aegyptia*, $2n = 30$; O - *Merremia cissoides*, $2n = 30$; P - *Manihot reniformis*, $2n = 36$. Todas as barras têm valor de $10\mu\text{m}$.

Manuscrito II

Caracterização palinológica de espécies da Tribo *Ingeae* Benth (ênfase para o Gênero *Inga* Mill.), Nordeste do Brasil

Artigo a ser enviado ao periódico: *Plant Systematics and Evolution*
ISSN: 2199-6881 (Online)

Caracterização palinológica de espécies da Tribo *Ingeae* Benth (ênfase para o Gênero *Inga* Mill.), Nordeste do Brasil

Genialdo Ramos dos Santos¹, Antônio de Padua de Oliveira Paula¹, e Reginaldo de Carvalho^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

²**Autor para correspondência:** reginaldo.ufrpe@gmail.com

RESUMO

Neste trabalho foram analisadas características polínicas de 40 espécies pertencentes a dez gêneros do Clado Mimosoide: *Abarema* Pittier, *Albizia* Durazz, *Cedrelinga* Ducke, *Chloroleucon* (Benth.) Britton & Rose, *Enterolobium* Mart., *Hydrochorea* Barneby & J. W. Grimes, *Inga* Mill., *Leucochloron* Barneby & J.W.Grimes, *Pithecellobium* Mart. e *Zygia* P. Browne. O material analisado foi coletado a partir do acervo do herbário PEUFR da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O botão floral foi hidratado e o material polínico analisado pela técnica de acetólise, sendo posteriormente mensurados, descritos, fotografados em microscópio óptico e os dados quantitativos submetidos a tratamentos estatísticos descritivo. Foi confirmada a presença de diferentes aglomerados polínicos entre as espécies analisadas contendo 16, 20, 24, 28 e 32 grãos de pólen formando as diferentes unidades de dispersão, apresentando heterogeneidade tanto entre os gêneros quanto entre as espécies de um mesmo gênero para a maioria das amostras. Foi possível caracterizar e diferenciar muitas das espécies mediante os dados quantitativos e qualitativos pelo número de grãos de pólen por unidade de dispersão, forma, simetria e tamanho das políades. Para os dados quantitativos foi possível determinar as maiores políades, onde a espécie *Inga blanchetiana* Benth., pertencente a seção *Longiflorae* (Benth.) T. D. Penn. apresentou a maior, com 187,5 x 150 μm , assim como a maior variação ocorreu para a seção *Inga* Benth. do mesmo gênero com políades apresentando diâmetros que variaram de 130 a 172,5 μm . Os dados obtidos constituem importante parâmetro de diferenciação entre os táxons, corroborando com estudos da taxonomia desta tribo.

Palavras chaves: Clado Mimosoide, Palinologia, Semi-Árido, Caatinga.

INTRODUÇÃO

Considerada como a terceira maior família no grupo das fanerógamas, Leguminosae apresenta aproximadamente 770 gêneros e 19.500 espécies (Lewis et al., 2005, 2013; LPWG 2013a), distribuindo-se principalmente pelas regiões tropicais, também ocorrendo em menor número em áreas de clima temperado. Atualmente está dividida em seis subfamílias: *Detarioideae*, *Cercidoideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Papilionoideae* e *Caesalpinioideae* (LPWG, 2017). Conforme Giulietti *et al.* (2005), no Brasil estima-se a ocorrência de 176 gêneros e 3.200 espécies de Leguminosae. Esta família ocupa os diferentes tipos vegetacionais brasileiros, sendo a mais numerosa em espécies, com predominância nas regiões fitogeográficas da Amazônia e Caatinga, onde na região do semi-árido nordestino estima-se ocorrer 570 espécies (QUEIROZ et al., 2006).

De acordo com a nova classificação proposta por Legume Phylogeny Working Group (LPWG, 2017), Mimosoideae deixa de ser uma subfamília de Leguminosae e passa a ocupar o Clado denominado Mimosoide dentro da subfamília Caesalpinioideae. Atribui-se a este Clado todos os gêneros pertencentes anteriormente a subfamília Mimosoideae, com aproximadamente mais de 3.270 espécies distribuídas em 78 gêneros com maior ocorrência em regiões tropicais e subtropicais (LEWIS et al., 2005). No território brasileiro avalia-se ocorrer 35 gêneros e 818 espécies para esse Clado (BFG, 2015), sendo este abrangendo quatro tribos: Acacieae Dumort., Ingeae Benth., Mimoseae Bronn e Mimosygantheae Burkart tratadas por Lewis et al., 2005. A tribo Ingeae é formada por aproximadamente 966 espécies compondo 36 gêneros (LEWIS; RICO ARCE 2005), onde no Brasil avalia-se ocorrer 16 gêneros e 300 espécies (LIMA et al., 2010). Dentre os gêneros existentes nesta tribo, *Inga* é o mais representativo com aproximadamente 300 espécies arbóreas (VIEIRA, 1997) e este mesmo gênero é subdividido em 14 seções (PENNINGTON, 1997).

O Clado Mimosoide apresenta características polínicas em que formam agrupamentos que podem ser mônades, tétrades ou políades em que o tipo políade se apresenta como a principal unidade de dispersão para este grupo, possibilitando determinar padrões exclusivos para diferentes táxons (GUINET, 1981). Para Salgado-Labouriau (1973), os grãos de pólen apresentam caracteres únicos, que se caracterizam em grande diversidade nos estudos taxonômicos, morfológicos e paleobotânicos, devido à variação morfológica destas unidades de dispersão. O estudo morfológico dos grãos de pólen possibilita a descrição de toda sua sequência com a unidade polínica, polaridade, simetria, tamanho, forma, abertura e textura da parede (BARTH & MELHEM, 1988).

Diversos estudos relatam a importância da caracterização e diferenciação das estruturas polínicas como base na identificação e agrupamentos de determinados táxons, com

isto favorecendo um melhor conhecimento da diversidade vegetal existente nos mais diversos ambientes. Desta forma, citam-se vários trabalhos realizados em especial para a tribo Ingeae.

Santos & Romão (2008) pesquisaram a morfologia do pólen de 21 espécies do gênero *Calliandra* ocorrentes na Chapada Diamantina da região Nordeste do Brasil e obtiveram resultados satisfatórios quanto a classificação e o agrupamento de diferentes espécies. Taisma (2013) analisou a composição polínica de 52 espécies do gênero *Inga*, conseguindo identificar diferenças entre as espécies, tanto no número de grãos formadores das unidades de dispersão quanto nas diferentes formas dessas estruturas. Com a finalidade de estabelecer similaridades e diferenças, Leython & Ruiz-Zapata (2013) descreveram as características polínicas de 13 espécies do gênero *Calliandra*, pertencente a tribo *Ingeae* e ocorrentes na Venezuela, sendo possível criar uma chave de identificação a partir dos dados palinológicos dessas espécies. Já Freitas Cruz et al. (2017) estudaram as características palinológicas de 14 táxons para as tribos *Ingeae* e *Mimoseae* e concluíram ser possível separar a maioria dessas espécies por meio das estruturas polínicas.

O presente trabalho teve como objetivo analisar e caracterizar as estruturas polínicas de espécies da tribo Ingeae, com ênfase no gênero *Inga*, todas ocorrentes em área de caatinga, Nordeste do Brasil, com a finalidade de identificar padrões característicos das estruturas dos grãos de pólen capazes de contribuir para um melhor conhecimento de características necessárias aos estudos taxonômicos das espécies estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Foram coletadas amostras de material reprodutivo de 60 espécies lenhosas de 13 gêneros do clado Mimosoide e da tribo Ingeae pertencentes ao acervo do herbário PEUFR da UFRPE e da Embrapa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) conforme descrito na (Tabela 1).

A partir do material reprodutivo foram realizadas as análises polínicas, pelo método da acetólise, iniciando com a técnica de hidratação dos botões florais com solução de água e glicerina (95:1) (SANTOS & ROMÃO, 2008), seguida da técnica de acetólise conforme descrito por ERDTMAN (1952). Após a acetólise foram feitas as montagens das lâminas (n = 3 para cada espécie), com gelatina glicerinada e posteriormente realizadas as medidas dos grãos de pólen (políade – unidade de dispersão) (n = 25 políades por lâmina) sob microscopia óptica (M.O) e fotografados em fotomicroscópio Leica modelo MD 2.500. A classificação e descrição da morfologia polínica ocorreram mediante metodologia de Punt et al. (2007). Os grãos de

pólen foram medidos até sete dias após a preparação das lâminas conforme SALGADO-LABOURIAU (1973).

As análises de estatística descritiva dos dados observados nos grãos de pólen das diferentes espécies estudadas ocorreu com o auxílio do software BioEstat versão 5.3 (AYRES et al. 2007), no qual foram utilizadas 25 medições de diferentes políades de cada espécie para o diâmetro maior, menor e a mediana utilizada como padrão para a espécie.

RESULTADOS

Todas as estruturas polínicas das espécies estudadas são caracterizadas em sua unidade de dispersão como políade, isto é, apresentando número superior a quatro grãos de pólen por unidade de dispersão.

1. Gênero *Abarema* Pittier - *Abarema cochleata* (Willd.) Barneby & JWGrimes (Fig. 1A), *Abarema cochlicarpus* (Gomes) Barneby & JWGrimes (Fig. 1B), *Abarema filamentosa* (Benth.) Pittier (Fig. 1C), *Abarema langsdorffii* Benth e *Abarema turbinata* (Benth.) Baarneby & J.W. Grimes.

As espécies deste gênero apresentam unidade de dispersão em políade acalimada, sendo com forma elíptica para *A. cochleata* e *A. cochlicarpus* e circular para *A. filamentosa*, *A. langsdorffii* e *Abarema turbinata*. Para *A. cochleata* foram observados 30 grãos de pólen formando a políade sendo 16 na região central (8 em cada um dos dois planos) e 14 na região periférica. A políade é considerada muito grande, isopolar, subprolato apresentando tamanho médio de 107,5 x 92,5 µm. A espécie *A. cochlicarpus* apresentou uma formação da políade com 24 grãos, sendo 12 na região central (6 em cada plano) e 12 na região periférica. Esta políade é considerada muito grande, isopolar, subprolato com tamanho médio de 105 x 82,5 µm. Já as espécies *A. filamentosa*, *A. langsdorffii* e *A. turbinata* foram as que apresentaram o menor número de grãos de pólen na formação de sua políade com 16 grãos, 8 na região central (4 para cada plano) e 8 na região periférica. A políade de *A. filamentosa* sendo considerada muito grande, isopolar, prolato esferoidal, com tamanho médio de 100 x 90 µm, enquanto que *A. langsdorffii* e *A. turbinata* foi observado ocorrência de políade grande, isopolar, prolato esferoidal e tamanho médio de suas políades de 92,5 x 87,5 e 95 x 90 µm respectivamente (Tabela 2).

2. Gênero *Albizia* Durazz - *Albizia lebeck* (L.) Benth. (Fig. 1D), *Albizia pedicellaris* (Dc.) L. Rico (Fig. 1E), *Albizia polycephala* (Benth.) Killip (Fig. 1F), *Albizia saman* (Jacq.) Merr. (Fig. 1G), *Albizia subdimediata* (Spling.) Barneby & JWGrimes (Fig. 1H).

Para o gênero *Albizia* foram observadas a ocorrência de políades acalimadas em suas unidades de dispersão com forma circular para as espécies *A. lebeck*, *A. pedicellaris*, *A. polycephala* e *A. subdimediata* compostas por 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4 em cada um dos planos) e 8 grãos periféricos. Suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal com tamanho médio de 80 x 75, 87,5 x 80, 80 x 72,5 e 62,5 x 60 µm respectivamente. Já a espécie *A. saman* apresentou políade com forma elíptica composta por 32 grãos de pólen, sendo 16 centrais (8 para cada um dos dois planos) e 16 periféricos. A políade foi considerada muito grande, isopolar, subprolato, com tamanho médio de 125 x 107,5 µm (Tabela 2).

3. Gênero *Calliandra* Bentham

Seção *Androcallis* Barneby – *C. bella* Benth. (Fig. 2A), *C. brevipes* Benth. (Fig. 2B), *C. longipes* Benth., *C. parvifolia* (Hook. & Arn.) Speg. (Fig. 2C), *C. surinamensis* Benth. (Fig. 2D), *C. squarosa* Benth., *C. tweedii* Benth., *C. virgata* Benth.

As espécies da seção *Androcallis* do gênero *Calliandra* apresentam sua unidade de dispersão em uma políade na forma elíptica, formada por 8 grãos, sendo 2 grãos centrais e 8 grãos periféricos em plano uniplanar. Todas as políades deste grupo aqui estudadas são consideradas muito grandes. A maior políade dentre as espécies analisadas foi observada para *C. surinamensis* com 187,5 x 110 µm e a menor em *C. parvifolia* com 132,5 x 87,5.

Seção *Monticola* E.R. Souza & L.P. Queiroz - *Calliandra bahiana* var *erythematos*a Barneby (Fig. 2E), *Calliandra elegans* Renvoize (Fig. 2G), *Calliandra lintea* Barneby (Fig. 2F), *Calliandra mucugeana* Renvoize (Fig. 2I), *Calliandra sincorana* Harms (Fig. 2H).

As espécies da seção *Monticola* do gênero *Calliandra* apresentam como a principal diferença entre as demais seções deste gênero a presença do apêndice na região apical de sua políade. Todas apresentam forma elíptica, formada por 8 grãos, sendo 2 grãos centrais e 8 grãos periféricos em plano uniplanar e são consideradas de muito grandes a gigantes. A maior políade foi observada na espécie *C. bahiana* var *erythematos*a com 240 x 125 µm e a menor em *C. sincorana* com 187,5 x 105 µm.

4. Gênero *Cedrelinga* Duckkee - *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke (Fig. 1I).

A espécie *C. cateniformis* apresenta como unidade de dispersão uma políade acalimada e com forma elíptica, formada por 28 grãos, sendo 16 centrais (8 em cada plano) e 12

periféricos, a políade é considerada grande, isopolar, subprolato e apresenta tamanho médio de 97,5 x 75 µm (Tabela 2).

5. Gênero *Chloroleucon* (Benth) Britton & Rose - *Chloroleucon dumosum* (Benth.) GPLewis (Fig. 2A), *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) GPLewis (Fig. 2B), *Chloroleucon mangense* (Jacq.) Britton & Rose (Fig. 2C).

As espécies do gênero *Chloroleucon* aqui estudadas apresentam sua unidade de dispersão em políade calimada, com forma elíptica para todas. Para *C. dumosum* foram observados 28 grãos de pólen formando a políade sendo 16 na região central (8 em cada um dos planos) e 12 na região periférica. A políade é considerada grande, isopolar, subprolato com tamanho médio de 80 x 67,5 µm. A espécie *C. foliolosum* apresentou uma formação da políade com 32 grãos, sendo 16 na região central (8 para cada plano) e 16 na região periférica, a políade é considerada grande, isopolar, subprolato com tamanho médio de 80 x 67,5 µm. Já a espécie *C. mangense* foi a que apresentou o menor número de grãos de pólen na formação de sua políade para este gênero com 24 grãos, 12 na região central (6 em cada um dos dois planos) e 12 na região periférica, a políade é considerada grande, isopolar, subprolato, o tamanho médio de 80 x 70 µm (Tabela 2).

6. Gênero *Enterolobium* Martt – *E. contortisiliquum* (Vell.) Morong. (Fig. 2D), *E. gummiferum* J. F. Macbr., *E. maximum* Ducke, *E. schomburgkii* Benth., e *E. timbova* Martt.

Para o gênero *Enterolobium* foram observadas a ocorrência de políades calimadas em suas unidades de dispersão com forma elíptica para as cinco espécies estudadas. *E. contortisiliquum* e *E. timbova* apresentam suas políades compostas por 32 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada um dos planos) e 16 periféricos. Suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal para *E. contortisiliquum* e subprolato para *E. timbova*, o tamanho médio das políades foram de 90 x 80 e 82,5 x 70 µm respectivamente (Tabela 2).

Já as espécies *E. gummiferum*, *E. maximum* e *E. schomburgkii* apresentam suas políades compostas por 28 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada um dos planos) e 12 grãos periféricos, suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal para a primeira espécie e subprolato para as duas últimas. O tamanho médio das políades foi de 92,5 x 85 µm para *E. gummiferum*, 87,5 x 75 µm para *E. maximum* e de 97,5 x 82,5 µm para *E. schomburgkii*. (Tabela 2).

7. Gênero *Hydrochorea* Barneby & J. W. Grimes – *H. corymbosa* (Rich.) Barneby & JWGrimes (Fig. 2E).

A espécie *H. corymbosa* apresenta como unidade de dispersão uma políade acalimada e com forma elíptica, formada por 28 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 para cada um dos dois planos) e 12 periféricos, a políade é considerada grande, isopolar, prolato esferoidal com tamanho médio de 72,5 x 65 µm (Tabela 2).

8. Gênero *Leucochloron* Barneby & J.W.Grimes – *L. incuriale* (Vell.) Barneby & JWGrimes.

A unidade de dispersão de *L. incuriale* apresenta uma políade acalimada e com forma elíptica, formada por 24 grãos, sendo 12 grãos centrais (6 por plano) e 12 periféricos. A políade é considerada grande, isopolar, subprolato e possui tamanho médio de 110 x 95 µm (Tabela 2).

9. Gênero *Pithecellobium* Mart – *P. albicaule* Britton & Rose (Fig. 2F), *P. diversifolium* Benth.(Fig. 2G), *P. dulce* (Roxb.) Benth. (Fig. 2H).

Nas espécies do gênero *Pithecellobium* foram observadas a ocorrência de políades acalimadas em suas unidades de dispersão com forma elíptica para *P. albicaule* e circular para *P. diversifolium* e *P. dulce*. A políade da espécie *P. albicaule* é composta por 28 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 para cada plano) e 12 periféricos, suas políades são consideradas grandes, isopolares, subprolato com tamanho médio de 105,5 x 87,5 µm. Nas espécies *P. diversifolium* e *P. Dulce* as políades são compostas por 16 grãos, sendo 8 grãos centrais (4 para cada um dos dois planos) e 8 periféricos, as políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal e tamanho médio de 77,5 x 72,5 e 67,5 x 65 µm respectivamente (Tabela 2).

10. Gênero *Samanea* (DC.) Merr. - *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & J.W.Grimes.

A espécie *S. tubulosa* apresenta uma políade como unidade de dispersão, calimada e com forma elíptica, formada por 30 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 por plano) e 14 grãos periféricos, a políade é considerada muito grande, isopolar, subprolato, o tamanho médio de 125 x 107,5 µm (Tabela 2).

11. Gênero *Zapoteca* H. M. Hern. - *Z. apoteca portoricensis* var. *portoricensis* (Jacq.) H.M.Hern.

Na espécie *Z. portoricensis* var. *portoricensis* foi observada a ocorrência de uma políade calimada com forma circular, formada por 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4

em cada um dos dois planos) e 8 grãos periféricos, sua políade é considerada muito grande, isopolar, prolato esferoidal, o tamanho médio de 117,5 x 112,5 µm (Tabela 2).

12. Gênero *Zygia* P. Browne - *Zygia cauliflora* (Willd.) Killip e *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes (Fig. 2I).

A unidade de dispersão de *Z. racemosa* apresenta uma políade acalimada e com forma circular, formada por 16 grãos, sendo 8 grãos centrais (4 em cada plano) e 8 grãos periféricos sendo considerada grande, isopolar, prolato esferoidal e tamanho médio de 75 x 67,5 µm. Enquanto que *Z. cauliflora* apresenta políade acalimada com forma elíptica, formada por 30 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 14 grãos periféricos, a políade é considerada muito grande, isopolar, subprolato, o tamanho médio de 100 x 87,5 µm. (Tabela 2).

13. Gênero *Inga* Mill.

Seção *Bourgonia* Benth. - *Inga Alba* (Sw.) Willd. (Fig. 3A), *Inga cylindrica* (Vell.) Mart., *Inga laurina* (Sw.) Willd. (Fig 3B), *Inga pezizifera* Benth., *Inga semialata* Willd. (Fig. 3C).

Para a seção *Bourgonia* foram observadas a ocorrência de políades acalimadas em suas unidades de dispersão com forma circular para as espécies *I. Alba*, *I. laurina*, *I. pezizifera* e *I. semialata*. Essas apresentaram políades compostas por 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4 em cada um dos dois planos) e 8 periféricos. Suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal com tamanho médio de 77,5 x 75, 87,5 x 77,5, 67,5 x 62,5 e 70 x 65 µm respectivamente (Tabela 2). A espécie *I. cylindrica* foi a única desta seção a apresentar políade de forma elíptica, acalimada, composta por 28 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada um dos dois planos) e 12 grãos periféricos, suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal, o tamanho médio de 92,5 x 85 µm (Tabela 2).

Seção *Inga* Benth. - *Inga edulis* Mart. (Fig. 3D), *Inga ingoides* (Rico) Willd. (Fig 3E), *Inga pilosula* (Rich.) J.F.Macbr., *Inga subnuda* Benth. (Fig. 3F), *Inga uruguensis* Hook. & Arn. (Fig. 3G), *Inga vera* subsp. *Affinis* (DC.) T.D. Penn. (Fig 3H), *Inga vera* Willd. (Fig. 3I).

As unidades de dispersão polínica das espécies da seção *Inga* são formadas de políades acalimadas em forma circular para *I. pilosula* e *I. uruguensis*, as demais espécies estudadas apresentam forma elíptica. As políades das espécies *I. edulis* e *I. subnuda* são composta por 32 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 16 grãos periféricos e 28 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 12 grãos periféricos. Suas políades são consideradas muito grandes, isopolares, prolato, o tamanho médio das políades foram de 172,5

x 122,5 e 157,5 x 112,5 µm respectivamente. As espécies *I. ingoides*, *I. vera* e *I. vera* subsp. *Affinis* apresentam políades formadas por 20 grãos de pólen, sendo 10 grãos centrais (5 em cada plano) e 10 periféricos para as duas primeiras e 24 grãos de pólen, sendo 12 grãos centrais (6 em cada plano) e 12 grãos periféricos, isopolares, muito grandes, subprolato de 162,5 x 135, 150 x 125 e 157,5 x 122,5 µm respectivamente. A espécie *I. pilosula* apresentou uma formação com 20 grãos de pólen na sua unidade de dispersão com distribuição similar as citadas anteriormente com o mesmo número de grãos por políade, sendo também considerada muito grande, no entanto, sua forma é definida como Prolato esferoidal e o tamanho médio de 120 x 112,5 µm. Já a espécie *I. uruguensis* apresentou na formação de sua políade 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4 em cada plano) e 8 grãos periféricos, isopolares, muito grandes, prolato esferoidal, o tamanho médio de 130 x 125 µm (Tabela 2).

Seção *Psedinga* Benth. - *Inga capitata* Desv. (Fig. 4A), *Inga dysantha* Benth. (Fig. 4B), *Inga disticha* Benth., *Inga leiocalycina* Benth. (Fig. 4C), *Inga maritima* Benth., *Inga ruiziana* G. Don., *Inga salzmanniana* Benth., *Inga stipularis* DC., *Inga velutina* Willd. e *Inga vulpina* Mart. ex Benth.

Em *Inga* sect. *Psedinga* foram observadas a ocorrência de políades acalimadas em suas unidades de dispersão com forma elíptica para as espécies *I. dysantha*, *I. capitata*, *I. leiocalycina*, *I. marítima* e *I. ruiziana*, sendo que a primeira espécie apresenta sua políade formada por 24 grãos de pólen, sendo 12 grãos centrais (6 em cada um dos dois planos) e 12 grãos periféricos, as demais com políades compostas por 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4 para cada plano) e 8 periféricos, isopolares, muito grandes para as duas primeiras e grandes para as três últimas, subprolato. O tamanho médio das políades foram de 180 x 145, 112,5 x 95, 92,5 x 82,5, 92,5 x 80 e 87,5 x 72,5 µm respectivamente. As espécies *I. disticha*, *I. salzmanniana* e *I. stipularis* apresentam forma circular, acalimadas, com políades compostas por 16 grãos de pólen, com 8 grãos centrais (4 em cada um dos dois planos) e 8 grãos periféricos, isopolares, muito grandes, prolato esferoidal, o tamanho médio de 137,5 x 127,5, 135 x 125 e 100 x 92,5 µm respectivamente. Já as espécies *I. velutina* e *I. vulpina* são formadas por políades compostas por 30 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 para cada plano) e 14 grãos periféricos, elíptica, acalimadas, isopolares, gigante e prolato para a primeira e muito grande e subprolato para a segunda, o tamanho médio de 235 x 167,5 e 175 x 145 µm respectivamente (Tabela 2).

Seção *Longiflorae* (Benth.) T. D. Penn. - *Inga blanchetiana* Benth. (Fig. 4D), *Inga cayennensis* Benth. (Fig. 4E) e *Inga rubiginosa* (Rich.) DC.

Nesta seção foi constatada a ocorrência de políades acalimadas, com forma elíptica, onde a espécie *I. blanchetiana* apresenta sua políade formada por 32 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 16 grãos periféricos muito grande, isopolar, subprolato e tamanho médio de 187,5 x 150 µm. Já *I. cayennensis* e *I. rubiginosa* apresentaram políades compostas por 30 grãos de pólen, sendo 16 grãos centrais (8 em cada um dos dois planos) e 14 grãos periféricos, isopolares, muito grande e subprolato para a primeira e gigante e prolato para a segunda, com tamanho médio de 165 x 137,5 e 202,5 x 140 µm respectivamente (Tabela 2).

Seção Leptinga Benth. - *Inga flagelliformis* (Vell.) Mart (Fig. 4E), *Inga heterophylla* Willd., *Inga sellowiana* Benth. (Fig 4G).

Para *Inga* sect. *Leptinga* foram observadas a ocorrência de políades acalimadas em suas unidades de dispersão com forma circular para as três espécies estudadas. *I. flagelliformis*, *I. heterophylla* e *I. sellowiana* apresentaram suas políades compostas por 16 grãos de pólen, sendo 8 grãos centrais (4 em cada plano) e 8 grãos periféricos, suas políades são consideradas grandes, isopolares, prolato esferoidal, o tamanho médio de 87,5 x 85, 77,5 x 70 e 75 x 67,5 µm respectivamente (Tabela 2).

Seção Tetragonae Benth. - *Inga striata* Benth. (Fig. 4H).

Pertencente a *Inga* sect. *Tetragonae* a espécie *I. striata* apresenta uma políade acalimada e com forma elíptica, formada por 30 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 em cada um dos dois planos) e 14 grãos periféricos, a políade é considerada muito grande, isopolar, subprolato, apresentando tamanho médio de 157,5 x 122,5 µm (Tabela 2).

Seção Multijugae Pennington - *Inga thibaudiana* Dc. (Fig. 4I).

A espécie *I. thibaudiana* pertence a sect. *Multijugae*, possuindo uma unidade de dispersão em políade acalimada e com forma elíptica, composta por 30 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 14 grãos periféricos, a políade é considerada muito grande, isopolar, prolato e tamanho médio de 157,5 x 117,5 µm (Tabela 2).

Seção Spectabiliss Pennington - *Inga splendens* Benth.

Para *Inga* sect. *Spectabilis* foi observada a ocorrência da espécie *I. splendens* apresentando forma elíptica, acalimada, composta por 28 grãos, sendo 16 grãos centrais (8 em cada plano) e 12 grãos periféricos, a políade é considerada muito grande, isopolar, prolato, o tamanho médio de 162,5 x 110 µm (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados nas análises polínicas das espécies estudadas dos diferentes gêneros da tribo *Ingeae* confirmam que a unidade de dispersão mais comumente encontrada para a subfamília Mimosoideae é a políade, confirmando o observado por Erdtman (1952).

As estruturas palinológicas observadas para as espécies dos diferentes gêneros estudados permitem estabelecer dois tipos de agrupamento, mediante estas serem consideradas como políades calimadas e acalimadas. Esta característica também foi proposta por Hernández (1986) para a maioria dos gêneros desta tribo, confirmando o proposto para os gêneros *Calliandra*, *Chloroleucon* e *Enterolobium* que são formadas por políades calimadas conforme descrito por SOUSA, (2007); SANTOS & ROMÃO (2008); BURIL, et.al (2010). O evento da presença de políade com estratificação calimada retrata ser este caráter distinto na diferenciação entre alguns gêneros na subfamília Mimosoideae em relação ao caráter de políade com estratificação acalimada (VAN CAMPO & GUINET, 1961). Portanto, este caráter possibilita diferenciar e agrupar taxonomicamente determinados gêneros dentro da tribo *Ingeae*.

As espécies *Chloroleucon dumosum*, *Chloroleucon foliolosum* e *Enterolobium contortisiliquum* pertencentes a tribo *Ingeae* foram analisadas por Buriel et al. (2010), sendo verificado que as três espécies apresentam políades caracterizadas como grandes, calimadas, elípticas e constituídas por 32 grãos de pólen, sendo *C. foliolosum* ligeiramente maior que *C. dumosum*. Os dados obtidos para estas três espécies neste trabalho corroboram com o descrito pelo referido autor com exceção do número de grãos de pólen observados na unidade de dispersão da espécie *C. dumosum* que foram de 28 grãos de pólen. O mesmo valor numérico de 32 grãos foi encontrado na políade de *E. timbova* sugerindo homogeneidade desta característica entre os dois táxons deste gênero. Já o número de grãos encontrados para a políade de *C. mangense* foi de 24 unidades, demonstrando haver heterogeneidade entre as espécies deste gênero, com isto, possibilitando a diferenciação destes táxons por meio de seus padrões polínicos.

Os dados obtidos para *Pithecelobium diversifolium* também corroboram com os encontrados por Buriel et al. (2010) para as características de tamanho, número de grãos e estrutura da políade. *Pithecellobium dulce* apresenta semelhanças para os caracteres descritos anteriormente, no entanto, para *P. albicaule* os valores numéricos encontrados diferenciam a espécie das demais, sendo esta composta por 28 grãos formando sua políade e de maior tamanho, possibilitando haver critérios de diferenciação entre os membros deste gênero.

Na análise numérica dos grãos de pólen que formam as diversas políades de onze dos treze gêneros e de sete das oitos seções de *Inga* investigadas neste estudo apresentaram e

confirmam a existência de políades com número superior a 16 grãos, sendo que as espécies do gênero *Calliandra* são as únicas com políades compostas por 8 grãos e distribuição uniplanar, demonstrando haver uma heterogeneidade para essa característica entre os diferentes gêneros e entre espécies de um mesmo gênero. Deste modo, estes resultados corroboram com o proposto por Van Campo & Guinet (19610; Guinet (1969); (1981); Sorsa (1969) para este Clado, em especial para tribo Ingeae, possibilitando ser a descrição palinológica um atributo eficiente na diferenciação de táxons deste grupo.

O gênero *Inga* foi o que apresentou o maior número de táxons analisados para esse estudo, sendo um total de trinta espécies e uma variedade, distribuídos em oito seções. Na caracterização das unidades de dispersão nestas espécies foi possível observar a heterogeneidade no número de grãos por políade, o valor constatado variou em 16, 20, 24, 28 e 32 grãos entre as espécies analisadas. Estudando a estrutura polínica de 52 espécies venezuelanas de *Inga*, Taisma (2013) relatou a existência de variação em número de grãos nas diferentes políades entre as espécies de 16 a 40 grãos. Nesse estudo o autor analisou as espécies *Inga alba* e *Inga laurina* verificando terem políades formadas por 16 grãos de pólen cada uma, já para as espécies *Inga cayennensis* com variação 28 a 32 por políade, *Inga leiocalycina* com 24, *Inga edulis* com 34 e *Inga thibaudiana* com 32 grãos, estes valores estão iguais ou próximos aos obtidos nas análises destas espécies para esse trabalho com exceção de *Inga leiocalycina* na qual só foi observada a ocorrência de apenas 16 grãos de pólen por políade. Os valores relativos ao tamanho das políades obtidos para a Venezuela diferem dos encontrados para as espécies da região Nordeste do Brasil. Isto pode ser explicado por se tratar de erro de identificação ou da variação ambiental entre os dois ecossistemas, fato que necessita ser melhor investigado.

Freitas Cruz et al. (2017) descreveram 14 taxa da subfamília *Mimosoideae* ocorrentes na Floresta Atlântica no estado do Rio de Janeiro, Brasil, para as tribos Ingeae e Mimoseae, dentre elas *Inga laurina*, *Inga marítima* e *Albizia polycephala* constatando a ocorrência de políades acalimadas e com número igual a 16 grãos de pólen na formação destas políades. Estes dados confirmam os observados no presente trabalho para as mesmas espécies ocorrentes na região nordeste do Brasil. Os dados obtidos por estes autores relatam a não possibilidade de diferenciar as espécies de *Inga* quanto ao número de grãos por políade, o que também foi detectado no presente trabalho quando compara-se o número de grãos de pólen para a seção *Bourgonia* da qual faz parte *Inga laurina* e outras duas espécies aqui mostradas. Entretanto, para *Inga marítima* a qual pertence a seção *Psedinga* foi possível constatar a existência de outras três espécies com o mesmo número de grãos na políade e uma espécie, *Inga dysantha* com 24 grãos compondo sua políade, diferenciando-se das demais espécies da mesma seção do gênero,

demonstrando ser a utilização desta ferramenta promissora na diferenciação de táxons a nível infragenérico.

A contribuição da caracterização por meio de diversos atributos observados nas estruturas polínicas de diferentes espécies e principalmente das pertencentes a tribo Ingeae possibilitaram definir padrões específicos para cada gênero ou espécie. Desta forma, o estudo dos palinórfos representa mais um subsídio na definição taxonômica de espécies muito próximas. Por se tratar de um método clássico relativamente de baixo custo na confecção dos resultados palinológicos, principalmente com o uso da microscopia óptica, o estudo polínico mais amplo dos diferentes táxons poderá contribuir para melhor classificação das espécies.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L. E SANTOS, A. A. 2007. *BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas*. Mamirauá. Belém, PA. 364 p.
- BARTH, O. M.; MELHEM, T.S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Campinas: Editora UNICAMP, 1988. 75 p.
- BURIL, M., F. DOS SANTOS & M. ALVES. 2010. Diversidade polínica das Mimosoideae (Leguminosae) ocorrentes em uma área de caatinga, Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. Bras.** 24(1): 53-64.
- ERDTMAN G (1952) Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms an introduction to palynology, 2nd edn. Almquist & Wikseus, Stockholm.
- FREITAS CRUZ, P.; MENDONÇA, C. B. F.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. Pollen morphology of selected species of tribes Ingeae and Mimoseae (Mimosoideae — Leguminosae) occurring in the Atlantic Forest of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**. 2017.
- GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia**. Curso de capacitação de monitores e educação. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. São Paulo, Instituto de Botânica, 2006. 9 p (apostila).
- GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L. & BERG, C. 2005. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology** 19: 632-639.
- GUINET, PH. 1969. Les Mimosacees – Etude de palynologie fondamentale correlations, evolution. **Travaux de la Section Scientifique et Technique** 9: 32-261.

- GUINET, PH. 1981. Comparative account of pollen characters in the Leguminosae. Pp. 789-799. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (ed.). **Advances in Legume Systematics** – part 2. Kew, Royal Botanic Gardens.
- GUINET, PH. Mimosoideae: the characters of their pollen grains. En Polhill, R.M. & P. H. Raven (eds.). *Advances in legume systematics, Part 2: 835-857*. **Royal Botanic Gardens, Kew**. Parte 2, pp. 835-857, 1981.
- HERNÁNDEZ, H.M. 1986. *Zapoteca*: A new genus of Neotropical Mimosoideae. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 73: 755–763.
- LEWIS, G.P. & RICO ARCE, M.L. 2005. Tribe Ingeae. In: Lewis, G. P.; Schrire, B.; Mackinder, B. & Lock, M. (eds.). **Legumes of the world**. The Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 193-213.
- LEWIS, G., SCHRIRE B., MACKINDER, B. & LOCK, M. (eds.) 2005. *Legumes of the World*. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.
- LEWIS, G.P., SCHRIRE, B.D., MACKINDER, B.A., RICO, L. & CLARK, R. 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context: A tool for collections management and taxon sampling. **S. African J. Bot.** 89: 76–84.
- LIMA, H.C. DE; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R. DE; FILARDI, F.L.R.; VALLS, J.F.M.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P. ; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C. DA; SILVA, M.J. DA; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V. DE; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I.B.; COSTA, J.; SOARES, M.V.B.; SNAK, C.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M. J.; MARTINS, M.V.; REIS, I.P.; CORDULA, E. 2015 *Fabaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group 2013a. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon** 62: 217–248.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon** 66 (1): 44–77.
- PENNINGTON, T.D.. **The Genus Inga Botany** Royal Botanical Garden 1997.

- PUNT, W.; HOEN, P. P.; BLACKMORE, S.; NILSSON, S.; LE THOMAS, A. Glossary of Pollen and Spore Terminology. **Review of Palaeobotany and Palynology** 143 (2007) 1–81p.
- QUEIROZ, L. P.; CONCEIÇÃO, A. A. G IULIETTI, A. M. Nordeste semi-árido: Caracterização e lista das species fanerógamas. In: QUEIROZ, L. P. GIULIETTI, A. M.(ed.) **Diversidade e Caracterização das Fanerógamas do Semi-árido Brasileiro**. Recife: Associação de Plantas do Nordeste. 2006. p. 165-180.
- SALGADO-LABOURIAU, M. L. Contribuição à palinologia dos cerrados. Rio de Janeiro, **Academia Brasileira de Ciências**, 1973.
- SANTOS, F. A. R.; ROMÃO, C. O. Pollen morphology of some species of *Calliandra* Benth. (*Leguminosae - Mimosoideae*) from Bahia, Brazil. **Grana**. v. 47, pp. 101-116, 2008.
- SORSA, P. 1969. Pollen morphological studies on the Mimosaceae. **Annales Botanici Fennici** 6: 1-34.
- SOUZA, E.R. de. 2007. *Estudos filogenéticos na tribo Ingeae (Leguminosae: Mimosoideae) com ênfase em Calliandra Benth. e gêneros afins*. Thesis, Universidade Estadual de Feira de Santana, Brazil.
- TAISMA, M. A. 2013. Caracterización de Políades en Especies Venezolanas del Género Inga Mill. (FABACEAE-MIMOSOIDEAE). **Acta Botánica Venezuéllica**. 36 (1): 1-14.
- VAN CAMPO M, GUINET PH (1961) Les pollens compose's. L'exemple des Mimosace'es. **Pollen Spores** 3:201–218.
- VIEIRA, M. G. G. A tribo *Ingeae* Bentham (Mimosaceae) na Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM. **Tese de doutorado do Curso de Pós Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do Convênio INPA/UFAM**. 1997.

APÊNDICES

Figuras

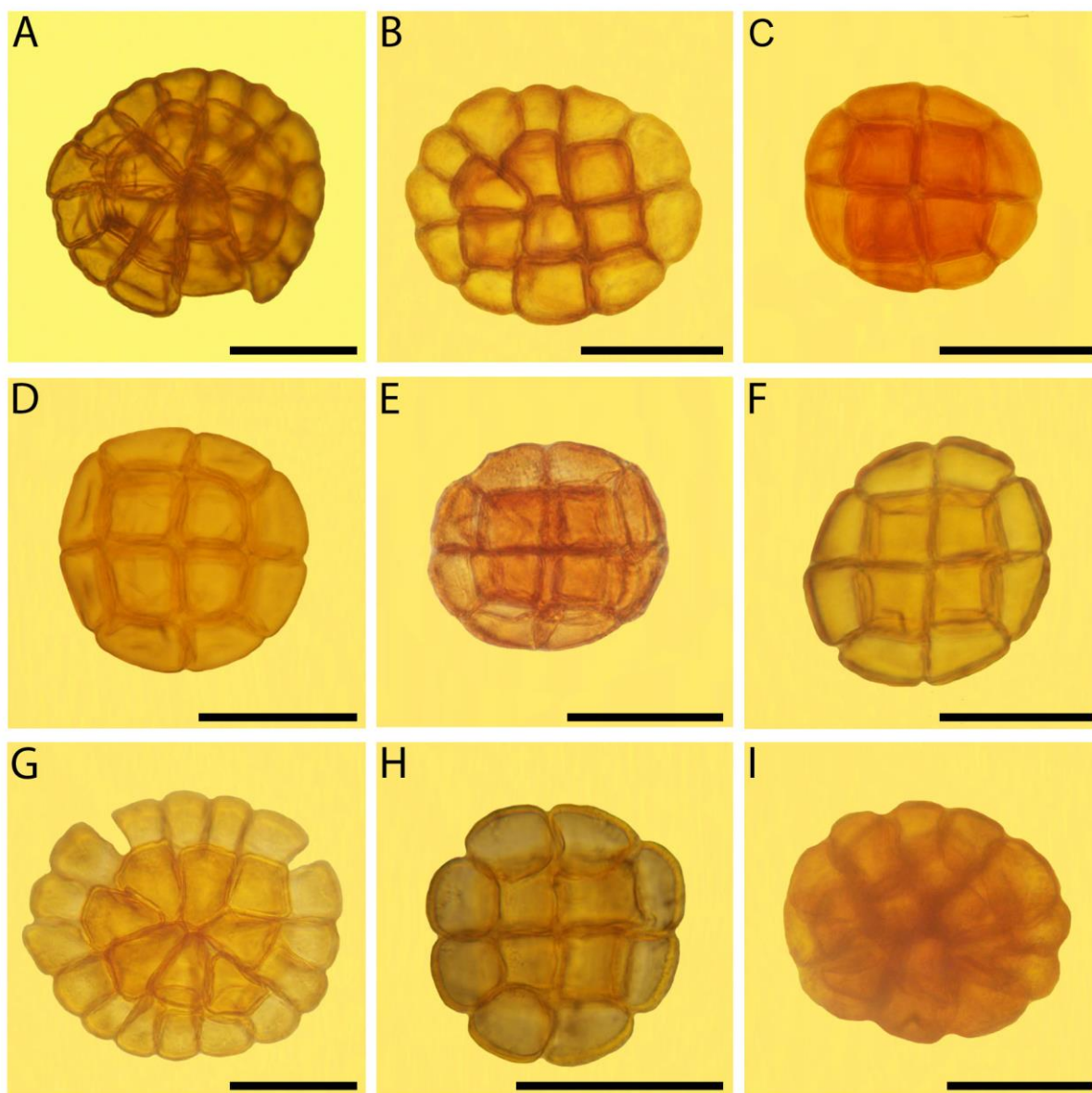


Figura I. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Abarema cochleata* (Willd.) Barneby & JWGrimes, (B) *Abarema cochlicarpos* (Gomes) Barneby & JWGrimes, (C) *Abarema langsdorffi* Benth.; (D) *Albizia lebeck* (L.) Benth., (E) *Abarema turbinata* (Benth.) Barneby & J.W.Grimes, (F) *Albizia polycephala* (Benth.) Killip, (G) *Albizia saman* (Jacq.) Merr., (H) *Albizia subdimidiata* (Spling.) Barneby & JWGrimes; (I) *Cedrelinga cateniformis* (Ducke) Ducke (todas as barras são iguais a 50µm).

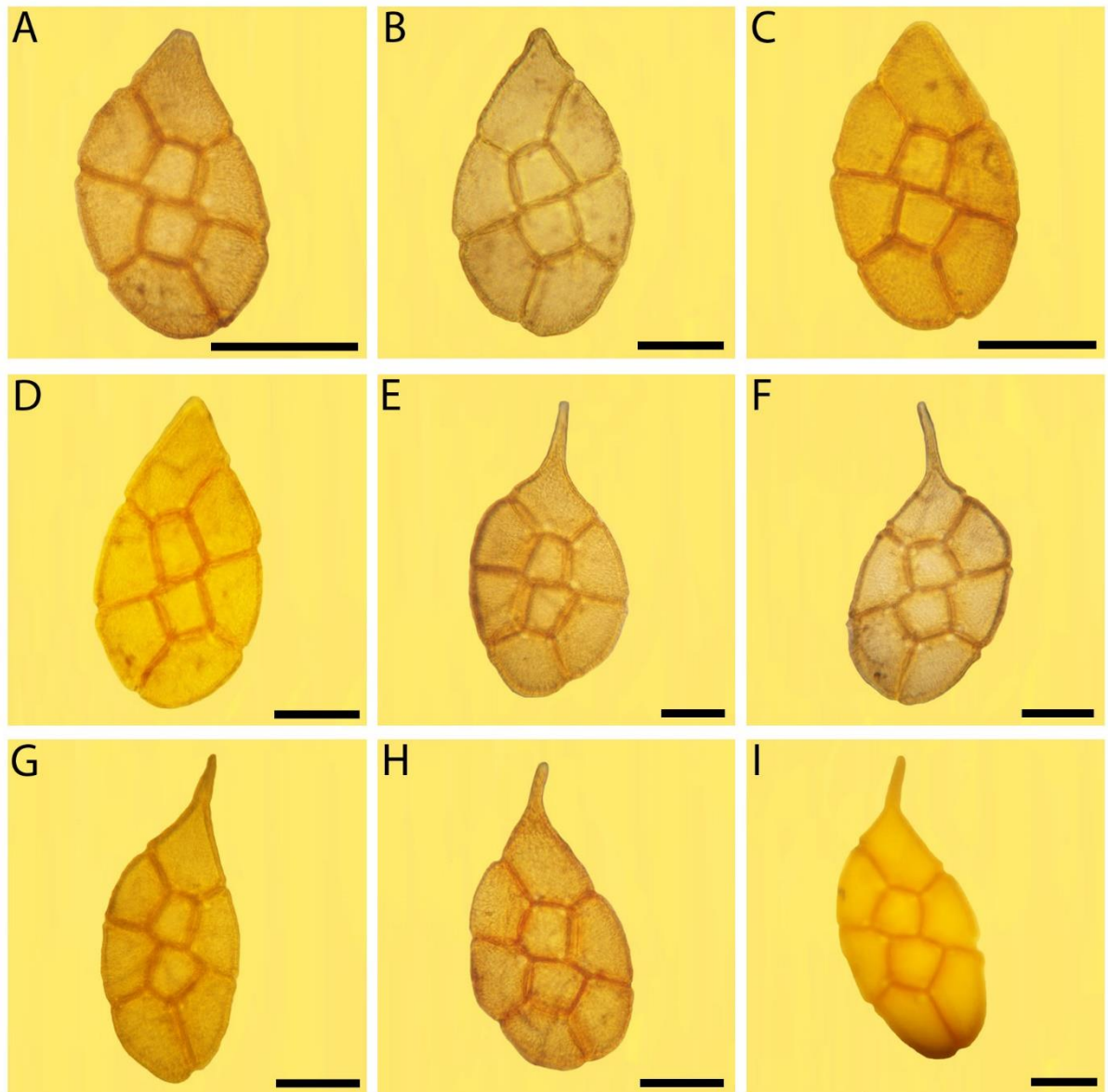


Figura II. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Calliandra bella* Benth., (B) *Calliandra brevipes* Benth., (C) *Calliandra parvifolia* (Hook. & Arn.) Speg.; (D) *Calliandra surinamensis* Benth., (E) *Calliandra bahiana* var *erythematos*a Barneby, (F) *Calliandra lintea* Barneby, (G) *Calliandra elegans* Renvoize, (H) *Calliandra sincorana* Harms e (I) *Calliandra mucugeana* Renvoize. (todas as barras são iguais a 50 μ m).

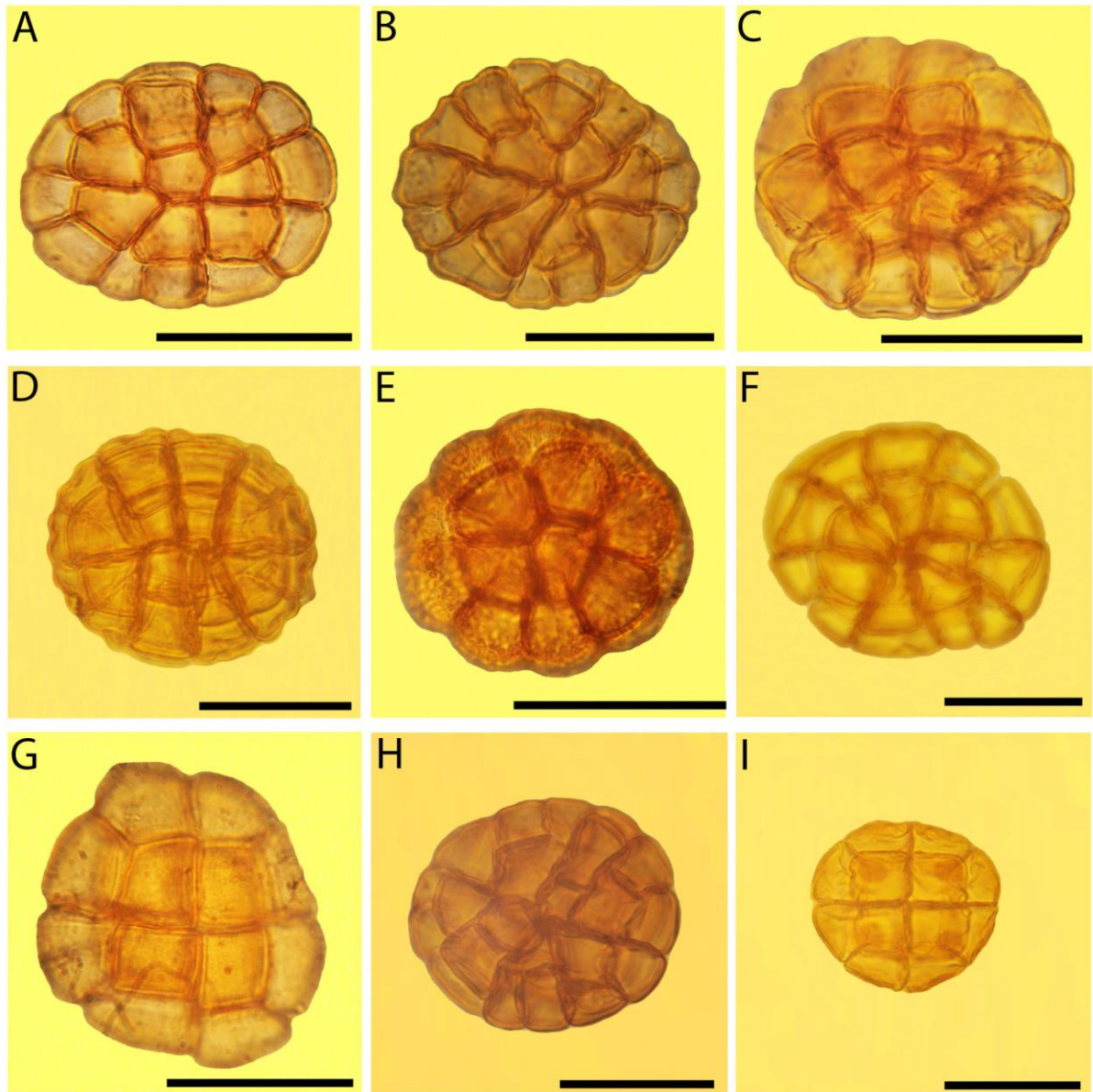


Figura III. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae. (A) *Chloroleucon dumosum* (Benth.) GPLewis, (B) *Chloroleucon foliolosum* (Benth.) GPLewis, (C) *Chloroleucon mangense* (Jacq.) Britton & Rose; (D) *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong.; (E) *Hydrochorea corymbosa* (Rich.) Barneby & JWGrimes; (F) *Pithecellobium albicaule* Britton & Rose, (G) *Pithecellobium diversifolium* Benth., (H) *Zygia cauliflora* (Willd.) Killip., e (I) *Zapoteca portoricensis* var. *portoricensis* (Jacq.) H.M.Hern (todas as barras são iguais a 50µm).

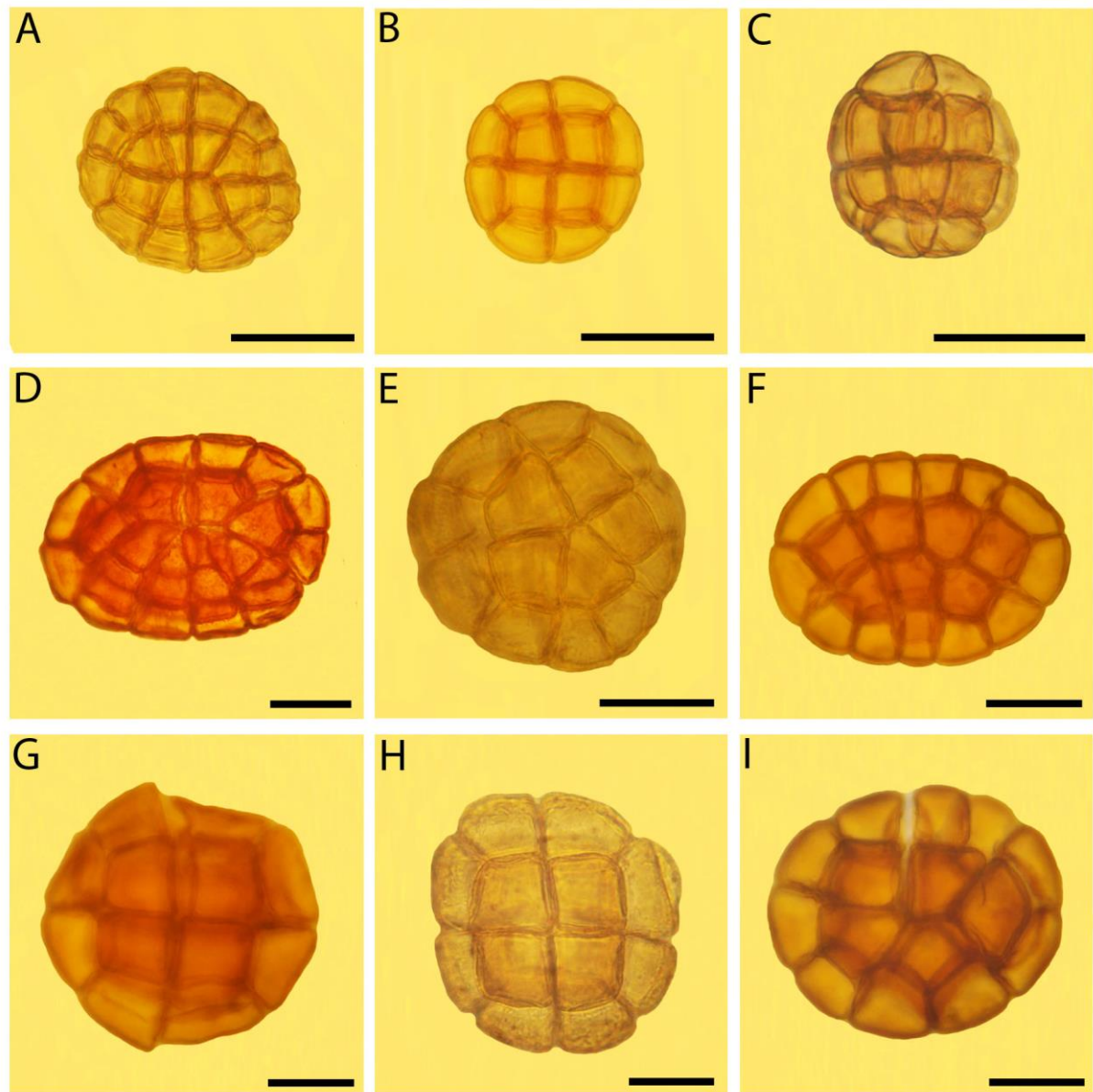


Figura IV. Políades de espécies pertencentes a tribo Ingeae, do gênero *Inga*: seção *Bourgonia*: (A) *Inga cylindrica* (Vell.) Mart., (B) *Inga pezizifera* Benth., (C) *Inga semialata* Willd. e seção *Inga*: (D) *Inga edulis* Mart., (E) *Inga pilosula* (Rico) J.F.Macbr., (F) *Inga subnuda* Benth., (G) *Inga uruguensis* Hook. & Arn., (H) *Inga vera* subsp. *Affins* (DC.) T.D.Penn., (I) *Inga vera* Willd. (todas as barras são iguais a 50µm).

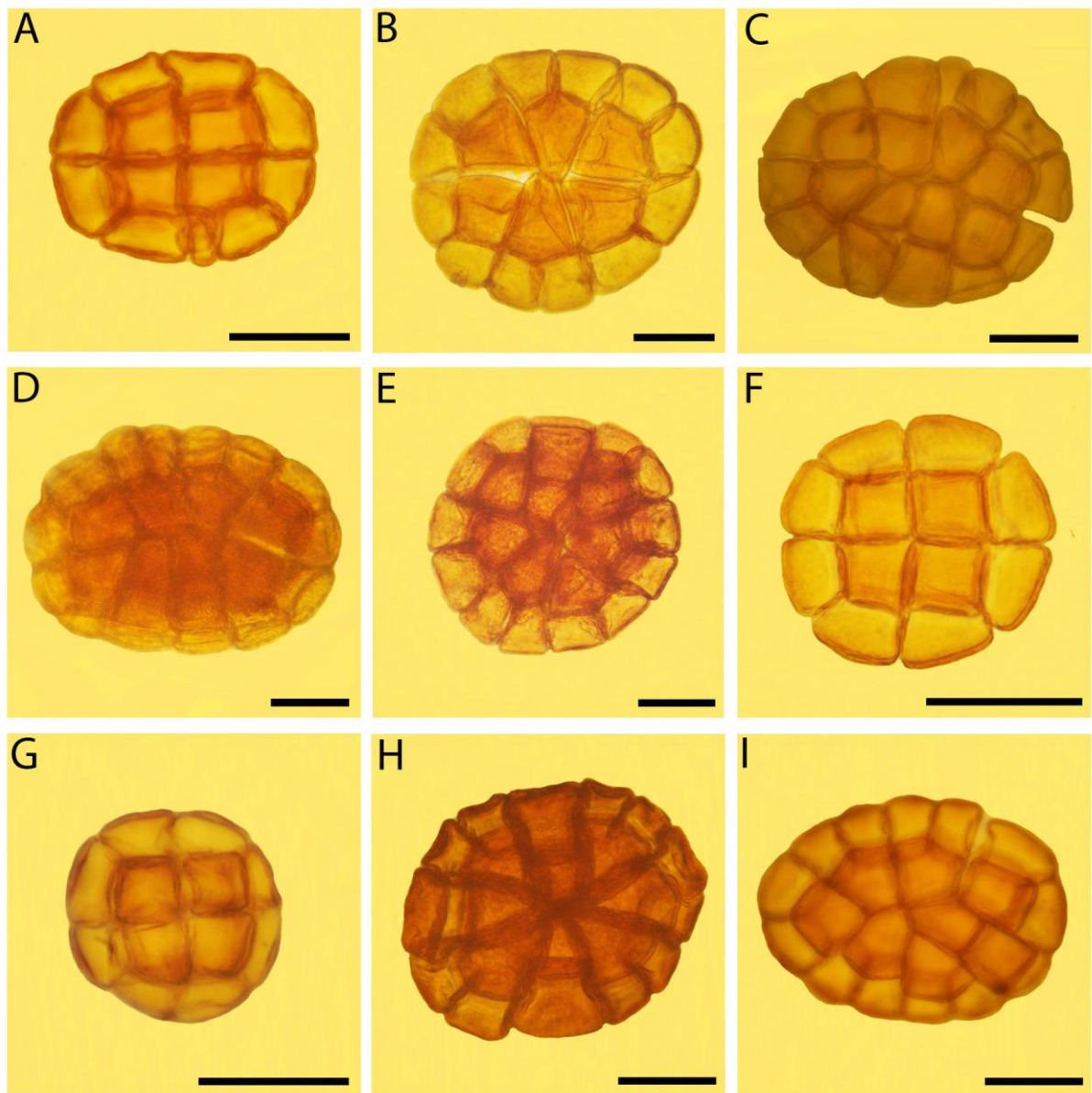


Figura V. Políades de espécies pertencentes a tribo *Ingeae*, do gênero *Inga*: seção *Psedingia*: (A) *Inga capitata* Desv., (B) *Inga dysantha* Benth., (C) *Inga vulpina* Mart. Ex Benth. ; seção *Longiflorae*: (D) *Inga rubiginosa* (Rich) DC., (E) *Inga cayennensis* Benth.; seção *Leptinga*: (F) *Inga flagelliformis* (Vell.) Mart., (G) *Inga sellowiana* Benth.; seção *Tetragonae*: (H) *Inga striata* Benth. e seção *Multijugae*: (I) *Inga thibaudiana* Dc.. (todas as barras são iguais a 50µm).

Tabela 1. Lista de espécies da *tribo* Ingeae utilizadas para a caracterização palinológica e seus respectivos número de registro do herbário PEUFR / UFRPE e da Embrapa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária IPA.

Gênero	Espécies	Registro
<i>Abarema</i> Pittier	<i>Abarema cochleata</i> (Willd.) Barneby & JWGrimes	PEUFR-32895
	<i>Abarema cochlicarpus</i> (Gomes) Barneby & JWGrimes	PEUFR-28312
	<i>Abarema filamentosa</i> (Benth.) Pittier	PEUFR-44123
	<i>Abarema langsдорffii</i> Benth	IPA-29301
	<i>Abarema turbinata</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes	IPA-15504
<i>Albizia</i> Durazz	<i>Albizia lebeck</i> (L.) Benth.	PEUFR-12431
	<i>Albizia pedicellaris</i> (Dc.) L. Rico	PEUFR-53909
	<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip	PEUFR-19659
	<i>Albizia saman</i> (Jacq.) Merr.	PEUFR-4203
	<i>Albizia subdimediata</i> (Spling.) Barneby & JWGrimes	PEUFR-39660
<i>Calliandra</i> Bentham	<i>Calliandra bella</i> Benth.	IPA-15518
	<i>Calliandra brevipes</i> Benth.	IPA-66540
	<i>Calliandra longipes</i> Benth.	IPA-17593
	<i>Calliandra parvifolia</i> (Hook. & Arn.) Speg.	IPA-16511
	<i>Calliandra surinamensis</i> Benth.	IPA-52727
	<i>Calliandra squarosa</i> Benth.	IPA-23714
	<i>Calliandra tweedii</i> Benth.	IPA-23723
	<i>Calliandra virgata</i> Benth.	IPA-20455
	<i>Calliandra bahiana</i> var <i>erythematos</i> a Barneby	IPA-32455
	<i>Calliandra elegans</i> Renvoize	IPA-32980
	<i>Calliandra lintea</i> Barneby	IPA-64815
<i>Calliandra mucugeana</i> Renvoize	IPA-32442	
<i>Calliandra sincorana</i> Harms	IPA-49982	
<i>Cedrelinga</i> Ducke	<i>Cedrelinga cateniformis</i> (Ducke) Ducke	PEUFR-14899
<i>Chloroleucon</i> (Benth.) Britton & Rose	<i>Chloroleucon dumosum</i> (Benth.) GPLewis.	PEUFR-8585
	<i>Chloroleucon foliolosum</i> (Benth.) GPLewis	PEUFR-22063
	<i>Chloroleucon mangense</i> (Jacq.) Britton & Rose	PEUFR-15702
<i>Enterolobium</i> Mart.	<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong.	PEUFR-34008
	<i>Enterolobium gummiferum</i> J.F.Macbr.	IPA-81835
	<i>Enterolobium maximum</i> Ducke	IPA-737
	<i>Enterolobium schomburgkii</i> Benth.	IPA-8379
	<i>Enterolobium timbova</i> Mart.	PEUFR-8649
<i>Hydrochorea</i> Barneby & J. W. Grimes	<i>Hydrochorea corymbosa</i> (Rich.) Barneby & JWGrimes	PEUFR-31951
<i>Inga</i> Mill.	<i>Inga alba</i> (Sw.) Willd.	PEUFR-35344
	<i>Inga blanchetiana</i> Benth.	PEUFR-42321
	<i>Inga capitata</i> Desv.	PEUFR-26271
	<i>Inga cayennensis</i> Benth.	PEUFR-2242
	<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	IPA-20972
	<i>Inga dysantha</i> Benth.	PEUFR-42271
	<i>Inga disticha</i> Benth.	IPA-7510
	<i>Inga edulis</i> Mart.	PEUFR-46797
	<i>Inga flagelliformis</i> (Vell.) Mart	PEUFR-26374
	<i>Inga heterophylla</i> Willd.	IPA-645
	<i>Inga ingoides</i> (Rico) Willd.	PEUFR-26269
	<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	PEUFR-28988
	<i>Inga leiocalycina</i> Benth.	PEUFR-14888

	<i>Inga maritima</i> Benth.	PEUFR-695
	<i>Inga pezizifera</i> Benth.	IPA-8411
	<i>Inga pilosula</i> (Rich.) J.F.Macbr.	IPA-651
	<i>Inga ruiziana</i> G. Don.	PEUFR-12274
	<i>Inga rubiginosa</i> (Rich.) DC.	IPA-7511
	<i>Inga salzmanniana</i> Benth.	IPA-73717
	<i>Inga sellowiana</i> Benth.	PEUFR-172
	<i>Inga semialata</i> Willd.	PEUFR-53174
	<i>Inga splendens</i> Benth.	IPA-7517
	<i>Inga stipularis</i> DC.	IPA-7528
	<i>Inga striata</i> Benth.	PEUFR-34014
	<i>Inga subnuda</i> Benth.	PEUFR-18349
	<i>Inga thibaudiana</i> Dc.	PEUFR-53899
	<i>Inga uruguensis</i> Hook. & Arn.	PEUFR-39829
	<i>Inga velutina</i> Willd.	IPA-5947
	<i>Inga vera</i> Subsp. <i>affinis</i> (Willd.) J. Leon	PEUFR-28983
	<i>Inga vera</i> Willd.	PEUFR-6953
	<i>Inga vulpina</i> Mart. ex Benth.	IPA-14968
<i>Leucochloron</i> Barneby & J.W.Grimes	<i>Leucochloron incuriale</i> (Vell.) Barneby & JWGrimes	PEUFR-174
<i>Pithecellobium</i> Mart.	<i>Pithecellobium albicaule</i> Britton & Rose	PEUFR-14977
	<i>Pithecellobium diversifolium</i> Benth.	PEUFR-14198
	<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	PEUFR-52211
<i>Samanea</i>	<i>Samanea tubulosa</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes	IPA-1603
<i>Zapoteca</i>	<i>Zapoteca portoricensis</i> var. <i>portoricensis</i>	IPA-48657
<i>Zygia</i> P. Browne	<i>Zygia cauliflora</i> (Willd.) Killip	IPA-15444
	<i>Zygia racemosa</i> (Ducke) Barneby & Grimes	PEUFR-34787

Tabela 2. Medidas dos tamanhos das políades, número de grãos por políades e padrão da políade das espécies da Tribo Ingeae ocorrentes na região Nordeste do Brasil. Dados de tamanho em μm para as políades.

Táxon da <i>Tribo Ingeae</i> Benth	Políade						NG P	NGc	NGp	Padrão da Políade
	Comprimento (μm)		Largura (μm)							
Abarema Pittier										
<i>Abarema cochleata</i> (Willd.) Barneby & JWGrimes	105	107,5	112,5	92,5	92,5	102,5	30	16	14	Subprolato
<i>Abarema cochlicarpus</i> (Gomes) Barneby & JWGrimes	87,5	105	122,5	70	82,5	92,5	24	12	12	Subprolato
<i>Abarema filamentosa</i> (Benth.) Pittier	92,5	100	115	75	90	100	16	8	8	Prolato
<i>Abarema langsdorffii</i> Benth	87,5	92,5	100	77,5	87,5	92,5	16	8	8	Prolato esférico
<i>Abarema turbinata</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes	87,5	95	105	80	90	100	16	8	8	Prolato esférico
Albizia Durazz										
<i>Albizia lebeck</i> (L.) Benth.	70	80	85	67,5	75	82,5	16	8	8	Prolato esférico
<i>Albizia pedicellaris</i> (Dc.) L. Rico	85	87,5	95	77,5	80	87,5	16	8	8	Prolato esférico
<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip	75	80	85	65	72,5	82,5	16	8	8	Prolato esférico
<i>Albizia saman</i> (Jacq.) Merr.	117,5	125	145	95	107,5	125	32	16	16	Subprolato
<i>Albizia subdimediata</i> (Spling.) Barneby & JWGrimes	57,5	62,5	70	55	60	67,5	16	8	8	Prolato esférico
Calliandra Bentham										
<u>Seção <i>Androcallis</i> Barneby</u>										
<i>Calliandra bella</i> Benth.	155	172,5	202,5	107,5	120	132,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra brevipes</i> Benth.	152,5	182,5	200	87,5	110	112,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra longipes</i> Benth.	137,5	167,5	177,5	90	95	105	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra parvifolia</i> (Hook. & Arn.) Speg.	125	132,5	150	75	87,5	97,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra surinamensis</i> Benth.	170	187,5	232,5	100	110	130	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra squarosa</i> Benth.	160	182,5	202,5	100	112,5	125	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra tweedii</i> Benth.	172,5	180	187,5	105	110	122,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra virgata</i> Benth.	167,5	180	190	95	107,5	117,5	8	2	6	Elipsóide
<u>Seção <i>Monticola</i> E.R. Souza & L.P. Queiroz</u>										
<i>Calliandra bahiana</i> var <i>erythematosa</i> Barneby	220	240	250	112,5	125	132,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra elegans</i> Renvoize	190	202,5	220	90	100	112,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra lintea</i> Barneby	215	237,5	260	100	112,5	132,5	8	2	6	Elipsóide
<i>Calliandra mucugeana</i> Renvoize	197,5	225	245	92,5	105	117,5	8	2	6	Elipsóide

<i>Calliandra sincorana</i> Harms	167,5	1887,5	202,5	100	105	117,5	8	2	6	Elipsóide
Cedrelinga Ducke										
<i>Cedrelinga cateniformis</i> (Ducke) Ducke	92,5	97,5	102,5	72,5	77,5	85	28	16	12	Subprolato
Chloroleucon (Benth.) Britton & Rose										
<i>Chloroleucon dumosum</i> (Benth.) GPLewis	70	80	87,5	62,5	67,5	75	28	16	12	Subprolato
<i>Chloroleucon foliolosum</i> (Benth.) GPLewis	77,5	85	100	65	75	87,5	32	16	16	Subprolato
<i>Chloroleucon mangense</i> (Jacq.) Britton & Rose	75	80	95	62,5	70	77,5	24	12	12	Subprolato
Enterolobium Mart.										
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong.	80	90	105	67,5	80	92,5	32	16	16	Prolato esferoidal
<i>Enterolobium gummiferum</i> J.F.Macbr.	82,5	92,5	100	75	85	87,5	28	16	12	Prolato esferoidal
<i>Enterolobium maximum</i> Ducke	75	87,5	95	70	75	82,5	28	16	12	Subprolato
<i>Enterolobium schomburgkii</i> Benth	87,5	97,5	105	75	82,5	97,5	28	16	12	Subprolato
<i>Enterolobium timbova</i> Mart.	75	82,5	87,5	67,5	70	75	32	16	16	Subprolato
Hydrochorea Barneby & J. W. Grimes										
<i>Hydrochorea corymbosa</i> (Rich.) Barneby & JWGrimes	65	72,5	82,5	57,5	65	72,5	28	16	12	Prolato esferoidal
Inga Mill.										
<u>Seção Bourgonia Bentham</u>										
<i>Inga Alba</i> (Sw.) Willd.	75	77,5	87,5	62,5	75	85	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga cylindrica</i> (Vell.) Mart.	85	92,5	97,5	80	85	92,5	28	16	12	Prolato esferoidal
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.	75	87,5	100	75	77,5	87,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga pezizifera</i> Benth.	62,5	67,5	72,5	60	62,5	70	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga semialata</i> Willd.	65	70	75	60	65	70	16	8	8	Prolato esferoidal
<u>Seção Longiflorae Pennington</u>										
<i>Inga blanchetiana</i> Benth.	147,5	187,5	212,5	125	150	175	32	18	14	Subprolato
<i>Inga cayennensis</i> Benth.	145	165	200	112,5	137,5	162,5	30	16	14	Subprolato
<i>Inga rubiginosa</i> (Rich.) DC.	192,5	202,5	230	125	140	157,5	30	16	14	Prolato
<u>Seção Psedinga Bentham</u>										
<i>Inga capitata</i> Desv.	92,5	112,5	120	87,5	95	105	16	8	8	Subprolato
<i>Inga dysantha</i> Benth.	155	180	205	137,5	145	162,5	24	12	12	Subprolato
<i>Inga disticha</i> Benth.	125	137,5	152,5	107,5	127,5	142,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga leiocalycina</i> Benth.	80	92,5	102,5	67,5	82,5	87,5	16	8	8	Subprolato
<i>Inga maritima</i> Benth.	80	92,5	102,5	72,5	80	110	16	8	8	Subprolato
<i>Inga ruiziana</i> G. Don.	82,5	87,5	92,5	67,5	72,5	80	16	8	8	Subprolato

<i>Inga salzmanniana</i> Benth.	125	135	145	115	125	137,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga stipularis</i> DC.	92,5	100	110	87,5	92,5	102,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga velutina</i> Willd.	192	235	250	140	167,5	1887,5	30	16	14	Prolato
<i>Inga vulpina</i> Mart. ex Benth.	155	175	192,5	125	145	162,5	30	16	14	Subprolato
<u>Seção Inga León</u>										
<i>Inga edulis</i> Mart.	145	172,5	200	100	122,5	140	32	20	12	Prolato
<i>Inga ingoides</i> (Rico) Willd.	145	162,5	162,5	100	135	147,5	20	10	10	Subprolato
<i>Inga pilosula</i> (Rich.) J.F.Macbr.	112,5	120	150	100	112,5	115	20	10	10	Prolato esferoidal
<i>Inga subnuda</i> Benth.	137,5	157,5	175	100	112,5	132,5	28	16	12	Prolato
<i>Inga uruguensis</i> Hook. & Arn.	122,5	130	137,5	100	125	132,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga vera</i> Willd.	132,5	157,5	175	100	122,5	132,5	20	10	10	Subprolato
<i>Inga vera</i> Subsp.affinis (DC.) T. D. Penn.	137,5	150	180	112,5	125	140	24	12	12	Subprolato
<u>Seção Leptiinga Bentham</u>										
<i>Inga flagelliformis</i> (Vell.) Mart	85	87,5	92,5	75	85	90	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga heterophylla</i> Willd.	70	77,5	87,5	62,5	70	80	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Inga sellowiana</i> Benth.	62,5	75	82,5	60	67,5	80	16	8	8	Prolato esferoidal
<u>Seção Tetragonae Pennington</u>										
<i>Inga striata</i> Benth.	147,5	157,5	175	105	122,5	145	30	16	14	Subprolato
<u>Seção Multijugae Pennington</u>										
<i>Inga thibaudiana</i> Dc.	137,5	157,5	172,5	110	117,5	132,5	30	16	14	Prolato
<u>Seção Spectabilis Pennigton</u>										
<i>Inga splendens</i> Benth.	137,5	162,5	192,5	100	110	127,5	28	16	12	Prolato
<u>Leucochloron Barbenby & J.W.Grimes</u>										
<i>Leucochloron incuriale</i> (Vell.) Barneby & JWGrimes	105	110	120	90	95	105	24	12	12	Subprolato
<u>Pithecellobium Mart.</u>										
<i>Pithecellobium albicaule</i> Britton & Rose	95	105,5	112,5	72,5	87,5	95	28	16	12	Subprolato
<i>Pithecellobium diversifolium</i> Benth.	70	77,5	90	65	72,5	82,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth.	65	67,5	80	57,5	65	70	16	8	8	Prolato esferoidal
<u>Samanea (DC.) Merr.</u>										
<i>Samanea tubulosa</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes	112,5	125	137,5	100	107,5	120	30	16	14	Subprolato
<u>Zapoteca H. M. Hern.</u>										
<i>Zapoteca portoricensis</i> var. <i>portoricensis</i>	100	117,5	125	100	112,5	117,5	16	8	8	Prolato esferoidal
<u>Zygia P. Browne</u>										
<i>Zygia cauliflora</i> (Willd.) Killip	90	100	112,5	75	87,5	105	30	16	14	Subprolato

<i>Zygia racemosa</i> (Ducke) Barneby & Grimes	67,5	75	87,5	62,5	67,5	75	16	8	8	Prolato esferoidal
--	------	----	------	------	------	----	----	---	---	--------------------

Manuscrito III

Evolução cromossômica: duplicações cromossômicas em *Calliandra Benth.* são as principais fontes de diversificação

Artigo a ser enviado ao periódico: *Protoplasma*

Online ISSN: 1615-6102

Evolução cromossômica: duplicações cromossômicas em *Calliandra Benth.* são as principais fontes de diversificação

Genialdo Ramos dos Santos¹, Maria Angellica Oliveira Marinho¹, Silmar Luiz da Silva¹, Antônio de Padua de Oliveira Paula¹, e Reginaldo de Carvalho¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A tribo Ingeae é um importante grupo de dentro da Caesalpinioideae, porém pouco explorado citogeneticamente, além disso apresenta grande complexidade filogenética. Objetivando caracterizar cromossomicamente seus indivíduos e situá-los num contexto evolutivo foi realizada uma análise citogenética comparativa. Para tanto, foram empregadas técnicas de colocação com fluorocromos CMA e DAPI e análise filogenética por inferência Bayesiana na qual foi utilizada para reconstrução do número cromossômico ancestral pelo ChromEvol. O número e padrão de distribuição das bandas CMA⁺ foram diferentes entre as espécies de *Calliandra* seção *Androcallis* tendo inclusive mais bandas do que a seção *Microcallis*. Essencialmente na seção *Androcallis* o número de bandas CMA⁺ não apresentou associação ao nível de ploidia. A reconstrução indica que o número cromossômico ancestral para a tribo Ingeae é $n = 13$. O gênero *Calliandra* apresentou número ancestral $n = 8$. O evento inferido com maior frequência foi o ganho cromossômico, porém, a duplicação apresentou o maior saldo líquido de diversificação.

Palavras-chave: ChromEvol, CMA/DAPI, Ingeae, diploidização, Caesalpinioideae

Introdução

As radiações evolutivas são comuns em muitas linhagens de plantas (Hughes e Atchison, 2015; Hughes et al., 2015), principalmente em florestas tropicais e neotropicais (Nicholls et al. 2015). Evidências, principalmente filogenéticas, sugerem que as radiações recentes são responsável por parte da riqueza das espécies (ver Hughes e Atchison, 2015; Hughes et al., 2015; Nicholls et al. 2015). Contudo, as linhagens que se irradiam rapidamente dificultam o estabelecimento de uma filogenia bem resolvida e apoiada, tornando-se um desafio (por exemplo, Hughes e Eastwood, 2006; Kursar et al., 2009; Fior et al., 2013). Ademais, as trajetórias de rápida diversificação de espécies através do tempo e do espaço e os mecanismos e processos evolutivos subjacentes permanecem pouco compreendidas (Nicholls et al. 2015), necessitando de estudos complementares.

Para produzir um conjunto de dados maiores, muitos estudos recentes estão usando outros parâmetros para subsidiá-los. A variabilidade cromossômica observada em diversos grupos de plantas com relação ao número cromossômico, seu número básico, coloração diferencial, localização da sequência DNAr, entre outros podem ser bastante informativas e vem se mostrando potencial na elucidação das relações filogenéticas e taxonômicas em grupos de plantas. Recentemente, Marinho et al. (2019) mostrou que a baixa resolução filogenética entre as famílias Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae e Talinaceae (clado ACPT de Cactineae) se deve a uma divergência desse clado num curto espaço de tempo, e que cada uma dessas famílias pode ser caracterizada por números cromossômicos básicos e eventos de evolução cariotípica exclusivos. Mostrando, a importância dessas sinapomorfias cariotípicas como apoio para melhorar o entendimento de grupos filogeneticamente complexos.

A tribo Ingeae é um importante grupo dentro do clado Mimosoide recentemente circunscrito na subfamília *Caesalpinioideae* (AZANI et al., 2017). Representantes da família Fabaceae geralmente são relacionados a importância econômica de culturas importantes (LEWIS; RICO ARCE, 2005). Atualmente programas como o The Legume Phylogeny Working Group (LPWG) tem se empenhado em estimular a pesquisa para aumentar o repertório do conhecimento da filogenia e evolução das leguminosas (AZANI et al., 2017; BRUNEAU et al., 2013).

Neste contexto, a citogenética oferece um leque de possibilidades no que concerne a investigação evolutiva por meio principalmente de caracterização cromossômica, a fim de identificar alterações numéricas e estruturais que são protagonistas do processo evolutivo principalmente das angiospermas. Neste estudo, investigamos a variação cariotípica em representantes da tribo Ingeae baseado em análises citogenéticas comparativas. Foram realizadas novas contagens de cromossomos e realizada dupla coloração de CMA / DAPI em

espécies de *Calliandra* Benth. Os dados citomoleculares foram analisados baseando-se em uma análise filogenética, a fim compreender o processo de evolução cariotípica na tribo Ingeae.

Material e métodos

Preparação e coloração de lâminas com CMA e DAPI

Pontas de raízes contendo tecido meristemático foram coletas e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2mM, por 4 horas a 18 °C, em seguida as raízes fixadas em Solução fixadora metanol /ácido acético glacial 3:1 (v/v) por 24 horas e estocadas em freezer a -20 °C.

O preparo de lâminas foi realizado inicialmente pela técnica de esmagamento proposto por (GUERRA; SOUZA, 2002) com pequenos ajustes.

Para a coloração com fluorocromos cromomicina A (CMA) e o 4',6-diamido-2-fenilindol (DAPI) foi adotada a metodologia de Schweizer e Ambros (1994). As lâminas foram envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e, posteriormente, coradas com CMA a 0,5 mg/mL, por 60 minutos e posteriormente coradas com DAPI 2 µg/ml por 30 minutos e, finalmente, montadas em tampão McIlvaine-glicerol (1:1).

Alinhamento das sequências e análise filogenética

A análise contou com 57 espécies dentre as quais 54 compõem o grupo interno e 3 o grupo externo (Tabela 1). Para análise foi gerada uma matriz 4995 caracteres. Para análise filogenética, foram escolhidos quatro marcadores sendo três plastidiais (*rpl32*, *rbcL* e *matK*) e um nuclear (ITS1-5.8S-ITS2). As buscas das sequências foram realizadas através do algoritmo busca BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) selecionando-se as com maior score. As sequências foram alinhadas através do MUSCLE (EDGAR, 2004). O modelo de evolução de sequência melhor suportado foi determinado para cada locus de forma independente usando o programa jModelTest v2.1.10(DARRIBA et al., 2012), onde os modelos evolutivos foram: TIM1+I+G para ITS1-5.8S-ITS2, TVM+G para *matK*, TVM para *rpl32* e TPM2uf+I para o *rbcL*. Como esses modelos não foram encontrados no MrBayes, utilizouse o modelo GTR na inferência Bayesiana que é o modelo mais comum usado para filogenia, foi executada utilizando-se o MrBayes 3.2.6 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001) em que a análise foi realizada por 10.000.000 de gerações, amostrando a cada 350 árvores. Os primeiros 25% das árvores amostradas foram descartados como burn-in, 20.000 árvores foram resgatas e selecionada a melhor topologia. A visualização e edição das árvores foram feitas no FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Reconstrução ancestral e inferência de mudanças no número de cromossomos

Os números cromossômicos das espécies da tribo Ingeae foram obtidos da literatura (Tabela 1). As contagens cromossômicas foram consideradas nos casos em que foi possível confirmar as contagens de cromossomos a partir de microfotografias. As espécies que apresentaram mais de um citótipo, apenas o menor número de cromossomos para cada espécie foi usado na reconstrução do número haploide ancestral. Utilizamos o ChromEvol 2.0 para reconstruir o número cromossômico haploide ancestral e para determinar em quais pontos e quantas vezes os níveis de ploidia mudaram ao longo da filogenia (GLICK; MAYROSE, 2014). O programa usa oito modelos, que assumem diferentes tipos de transições entre os números cromossômicos: ganho (referido como fissões), perda (referida como fusão), poliploidização e semi-poliploidização. O melhor encaixe modelo foi avaliado usando a AIC (Critério de Informação de Akaike). Os modelos que incluíram semi-poliploidização foram excluídos, pois este modelo assume que espécies teriam cariótipos $2n = 3x$, o que não ocorre.

Resultados

Nossos resultados indicam que o provável número cromossômico ancestral da tribo Ingeae é $n = 13$. A reconstrução do ChromEvol indica que três eventos ocorreram em Ingeae, com uma frequência de ganho (disploidia ascendente por fissão), perda (disploidia descendente por fusão) e duplicação (poliploidização) iguais a 9, 7 e 6.5, respectivamente. O ganho cromossômico foi o evento de maior frequência, porém a duplicação foi o que melhor se distribuiu, tendo ocorrido em cinco linhagens concentradas apenas nos ramos terminais. As fusões igualmente ocorreram em cinco momentos, porém estão presentes nos ramos mais internos originando o clado *Calliandra* ($n = 13 \rightarrow$ fusão $\rightarrow n = 9$), seguindo duas outras fusões ($n = 9 \rightarrow$ fusão $\rightarrow n = 8$), em que uma originou o clado com as seções *Calliandra* e *Septentrionales* e o clado com as seções *Microcaliis* e *Androcallis* (Figura 1).

No gênero *Calliandra* houveram cinco eventos importantes, disploidia ascendente ($n = 8 \rightarrow$ fusão $\rightarrow n = 11$) originando *C. physocalyx* na seção *Calliandra*. Na seção *Microcallis*, uma duplicação foi responsável por originar *C. depauperata* ($n = 8 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 16$). Na seção *Androcallis*, *C. pittieri* foi originado por duplicação ($n = 8 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 16$), *C. sessillis* por outro lado originou-se de dois eventos de duplicação consecutivos ($n = 8 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 16 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 32$). *Calliandra dysantha* originou-se de disploidia ascendente seguida de duas duplicações consecutivas ($n = 8 \rightarrow$ fissão $\rightarrow n = 10 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 20 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 40$).

Os demais gêneros da tribo Ingeae, apresentaram-se constante com $n = 13$, indicando que eventos de variação cromossômica ancestrais são quase exclusivos ao gênero *Calliandra*, exceto por *Albizia polycephala* ($n = 13 \rightarrow$ duplicação $\rightarrow n = 26$) (Figura 1). Ainda que não sejam observadas variações nos ancestrais dos demais gêneros, contagens cromossômicas na

Tribo apresentam grande variação no nível de ploidia, desde citótipos tetraplóide (*Inga laurina*, $2n = 4x = 52$), octaploide (*Albizia polyphylla*, $2n = 8x = 104$) e decaploide (*C. dysantha*, $2n = 10x = 80$).

O número cromossômico e o padrão de distribuição de bandas CMA⁺ são mostrados na tabela 1 e figura 1, respectivamente. O número de bandas e distribuição de CMA⁺ não estiveram relacionados ao nível de ploidia entre as espécies da seção *Androcallis*. Espécies aparentadas como em *C. dysantha* ($2n = 10x = 80$, 10 CMA⁺) e *C. macrocalyx* ($2n = 2x = 16$, 8 CMA⁺) apresentaram características cariológicas bastante distintas. No entanto, houveram similaridades entre número e distribuição de bandas CMA⁺ entre *C. ulei*, *C. humbellifera*, *C. arisii* e *C. riparia* ($2n = 2x = 16$, 6 CMA⁺). *Calliandra sessillis* ($2n = 4x = 32$, 4 CMA⁺) apresenta o mesmo número de bandas que *C. macrocalyx*, porém esta apresenta banda CMA⁺ no braço longo de apenas um par cromossômico, enquanto *C. sessillis* possui todas as bandas no braço longo. Na seção *Microcallis*, *C. depauperata* ($2n = 4x = 32$) e *C. leptododa* ($2n = 2x = 16$) apresentam ambas 4 sinais de CMA⁺, porém localizados em *C. depauperata* apenas nos braços longos, enquanto que em *C. leptopoda* se encontra no braço longo de um par cromossômico e outra no braço curto.

Discussão

A filogenia da tribo Ingeae mostra-se bastatanete desafiadora. Segundo Lavin et al. (2005), as Mimosoideae apresentam uma baixa taxa de variação nucleotídica para os genes *matK* e *rbcL*, o que pode explicar os grupos fracamente sustentados nos recentes estudos filogenéticos (LUCKOW et al. 2003; MILLER et al. 2003), mesmo com análises filogenética com quatro marcadores (plastidiais: *rpl32*, *rbcL* e *matK*, e nuclear: ITS1-5.8S-ITS2) o grupo ainda apresenta muitas politonias e dúvidas a respeito de sua história evolutiva. Evidências fósseis e os dados moleculares combinados apontam essa baixa variação nucleotídica como resultado da recente diversificação (15- 40Ma) e a extinção de muitos dos seus táxons no início do Terciário (LAVIN et al. 2005).

Os registros para o número cromossômico da tribo Ingeae são poucos em relação ao seu número de espécies. O numero básico ancestral inferido para Ingeae foi $n = 13$ e se manteve nos diversos gêneros da tribo, , indicando estabilidade cariotípica, com excessão de *Calliandra* com $n = 9$ (maior probabilidade). Pode-se observar que, no geral, a evolução do número cromossômico foi mais intensa neste gênero, indicando que eventos de variação cromossômica ancestrais são quase exclusivos a ele, ou mesmo pela carência de registros para mais espécies. Em *Albizia polycephala* o número cromossômico é resultado de uma duplicação, mas mateve seu número básico ancestral $n = 13$.

Apesar de $n = 9$ ter sido apontada como a maior probabilidade da reconstrução ancestral para o clado *Calliandra* (indicado pela seta, figura 1), o $n = 8$ (segunda maior probabilidade) e parece mais próximo do que é observado na natureza, visto que a maior parte dos representantes do gênero são múltiplos de $n = 8$. A diferença na probabilidade desses números básicos ancestrais foi muito pequena e deve ter sido originada devido *Calliandra physocaliyx* H.M.Hern. & M.Sousa da seção *Calliandra* que apresenta $n = 11$, diferentemente das outras espécies do gênero. Essa espécie ao que aparenta, é endêmica de uma região do México (GBIF 2019) podendo ter passado por recente processo de especiação. Nesse sentido, o ChromEvol deve ser usado não apenas para investigar estados ancestrais, mas também para interpretar os eventos responsáveis pelas mudanças no número de cromossomos ao longo das filogenias (COSTA et al., 2017). Além do número cromossômico básico diferenciado dos demais gêneros da tribo, *Calliandra* apresenta outras características peculiares em relação a tribo Ingeae e, até mesmo, em relação às demais Mimosoideae. Enquanto a maioria das Mimosoideae apresentam prefloração valvar e iniciação simultânea, *Calliandra* tem sépalas com prefloração imbricada e iniciação unidirecional; além de estames com iniciação helicoidal diferentemente dos com iniciação simultânea nas demais Mimosoideae (PRENNER 2004, 2005).

Apesar de $n = 9$ ter sido apontada como a maior probabilidade da reconstrução ancestral para o clado *Calliandra* (indicado pela seta, figura 1), o $n = 8$ (segunda maior probabilidade) e parece mais próximo do que é observado na natureza, visto que a maior parte dos representantes do gênero são múltiplos de $n = 8$. A diferença na probabilidade desses números básicos ancestrais foi muito pequena e deve ter sido originada devido *Calliandra physocaliyx* H.M.Hern. & M.Sousa da seção *Calliandra* que apresenta $n = 11$, diferentemente das outras espécies do gênero. Essa espécie ao que aparenta, é endêmica de uma região do México (GBIF 2019) podendo ter passado por recente processo de especiação. Nesse sentido, o ChromEvol deve ser usado não apenas para investigar estados ancestrais, mas também para interpretar os eventos responsáveis pelas mudanças no número de cromossomos ao longo das filogenias (COSTA et al., 2017). Além do número cromossômico básico diferenciado dos demais gêneros da tribo, *Calliandra* apresenta outras características peculiares em relação a tribo Ingeae e, até mesmo, em relação às demais Mimosoideae. Enquanto a maioria das Mimosoideae apresentam prefloração valvar e iniciação simultânea, *Calliandra* tem sépalas com prefloração imbricada e iniciação unidirecional; além de estames com iniciação helicoidal diferentemente dos com iniciação simultânea nas demais Mimosoideae (PRENNER 2004, 2005).

Os principais eventos de variação cromossômica (fissões e duplicações) foram observados em ramos terminais, isso também foi observado em outros grupos de plantas (CORREIA-DA-SILVA et al. 2014; MOTA et al. 2016; MARINHO et al. 2019). As fissões são mais frequentes, no entanto, elas se concentraram principalmente em *C. dysantha* (frequência de fissão, 8/9). Já a duplicação apresentou-se distribuída em cinco ramos originando 4 espécies em *Calliandra* e uma em *Albizia* (frequência de duplicação, 6/7), apresentando um maior origem de novas espécies. Por outro lado, as fusões ocorreram em ramos internos, contribuindo principalmente na formação do clado *Calliandra* ($n = 13 \rightarrow$ fusão $\rightarrow n = 8$), indicando que eventos de fusão são neutros em relação aos processos de diversificação de longo prazo, não aumentando ou diminuindo substancialmente os processos de especiação (ESCUADERO et al., 2014).

Apenas os dados do padrão de bandas CMA⁺ não representa um parâmetro eficiente para diferenciação de espécies na seção *Androcallis* devido a presença de quatro espécies com mesmo padrão, mas pode ser usado para diferenciar outras espécies na mesma seção. Naturalmente era de se esperar que espécies poliploides apresentassem números de bandas CMA⁺ proporcionais ao nível de ploidia, porém em *Calliandra* todos os poliploides analisados apresentaram número de bandas sem correspondência com nível de ploidia quando comparado com espécies diploides aparentadas, como por exemplo, *C. depauperata* e *C. leptopoda*. Durante o processo evolutivo, principalmente nas angiospermas, genes duplicados são muitas vezes eliminados no processo de diploidização pós-duplicação (GARSMEUR et al., 2014; MANDÁKOVÁ; LYSAK, 2018), onde há frequentes eventos de rearranjos cromossômicos com inversões e translocações (MANDAKOVA; LYSAK, 2008). Este cenário de é observado entre *C. depauperata* e *C. leptopoda*, em que possivelmente ocorreu uma inversão.

A diploidização e conseqüentemente rearranjos cromossômicos são geralmente observados em espécies que sofreram duplicação precoce (MANDAKOVA; LYSAK, 2008; SOUZA et al., 2016), assim o padrão de bandas não foi efetivo em mostrar evidências de rearranjos ainda que em *Calliandra*, várias espécies sejam derivadas de duplicação recente (< 5Ma) (DE SOUZA et al., 2013). Em *Phaseolus vulgaris* foram observadas poucas inversões quando comparado com *P. lunatus*, que provavelmente alteraram a posição do centrômero, onde as principais diferenças cariotípicas foram associadas à fração de DNA repetitiva. Em muitos grupos são observadas tendência a redução do genoma (PUTTICK; CLARK; DONOGHUE, 2015) que reflete a diploidização em curso, com a redução do número de cromossomos e redução do número de bandas CMA (COSTA et al., 2017).

Referências

- AMBROS, P. F.; MATZKE, M. A.; MATZKE, A. J. M. Detection of a 17 kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by in situ hybridization. **Chromosoma**, v. 94, n. 1, p. 11–18, 1986.
- ANAMTHWAT-JÓNSSON, K. Preparation of chromosomes from plant leaf meristems for karyotype analysis and in situ hybridization. **Methods in Cell Science**, v. 25, n. 3–4, p. 91–95, 2003.
- ANDRAS, S. C. et al. A drop-spreading technique to produce cytoplasm-free mitotic preparations from plants with small chromosomes. **Chromosome Research**, v. 7, n. 8, p. 641–647, 1999.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44–77, 2017.
- BELLING, J. On counting chromosomes in pollen-mother cells. **American Naturalist**, v. 55, n. 641, p. 573–574 ST–On counting chromosomes in pollen–mo, 1921.
- BRUNEAU, A. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2013.
- CARVALHO, C. R. DE; SARAIVA, L. S. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142–145, 1993.
- CORREIA-DA-SILVA M, VASCONCELOS S, SOARES MLC, MAYO SJ, BENKO-ISEPPON AM. Chromosomal diversity in *Philodendron* (Araceae): taxonomic significance and a critical review. **Plant Systematic Evolution**. 300:1111–1122. 2014.
- COSTA, L. et al. Comparative cytomolecular analyses reveal karyotype variability related to biogeographic and species richness patterns in Bombacoideae (Malvaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, n. 9, p. 1131–1144, 2017.
- DARRIBA, D. et al. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DE SOUZA, É. R. et al. Phylogeny of *Calliandra* (Leguminosae: Mimosoideae) based on nuclear and plastid molecular markers. **Taxon**, v. 62, n. 6, p. 1200–1219, 2013.
- DOYLE, J. D.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 19, p. 11–15, 1987.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- ESCUADERO, M. et al. Karyotypic changes through dysploidy persist longer over evolutionary time than polyploid changes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

- EVANS, P. K.; COCKING, E. C. Isolated plant protoplasts. In: STREET, H. E. (Ed.). . **Plant Tissue and Cell Culture**. 2. ed. Berkeley: Univ. of Calif. Press, 1977. p. 101–135.
- FELTRE, R. **Quimica volume 2**. 6. ed. São Paulo: Moderna, 2005.
- FIOR, S.; LI, M.; OXELMAN, B.; VIOLA, R.; HODGES, S.A.; OMETTO, L.; Et al. Spatio temporal reconstruction of the *Aquilegia* rapid radiation through next- generation sequencing of rapidly evolving cpDNA regions. **NewPhytol.** 198, 579–592. 2013. doi:10.1111/nph.12163.
- GARSMEUR, O. et al. Two evolutionarily distinct classes of paleopolyploidy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 2, p. 448–454, 2014.
- GBIF - Global Biodiversity Information Facility. Disponível em: < <https://www.gbif.org/>> Acessado em 13 de fevereiro de 2019.
- GEBER, G.; SCHWEIZER, D. Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. **Plant Systematics and Evolution**, v. 158, n. 2–4, p. 97–106, 1988.
- GLICK, L.; MAYROSE, I. ChromEvol: Assessing the pattern of chromosome number evolution and the inference of polyploidy along a phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 7, p. 1914–1922, 2014.
- GOULD, A. R. Staining and nuclear cytology of cultured cells. In: VASIL, I. K. (Ed.). . **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 5p. 698–711.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. DE. **Como observar cromossomos: Animal e Humana**. 1. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.
- HANSON, L. Some new chromosome counts in the genus *Inga* (Leguminosae : Mimosoideae). **Kew Bulletin**, v. 50, n. 4, p. 801–804, 1995.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.
- HUGHES, C. ; EASTWOOD, R. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after up lift of the Andes. **Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.** 103, 10334–10339. 2006. doi:10.1073/pnas.0601928103
- HUGHES, C.E.; ANDATCHISON, G.W. The ubiquity of alpine plant radiations: from the Andes to the Hengduan Mountains. **NewPhytol.** 207,275–282. 2015.doi: 10.1111/nph.13230
- HUGHES, C.E., Nyffeler, R., and Linder, H.P. (2015). **Evolutionary plant radiations: where, when, why and how?** *NewPhytol.* 207,249–253. doi:10.1111/nph.13523
- KATO, A. et al. Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation.

- Biotechnic and Histochemistry**, v. 81, n. 2–3, p. 71–78, 2006.
- KATO, A.; LAMB, J. C.; BIRCHLER, J. A. Chromosome painting using repetitive DNA sequences as probes for somatic chromosome identification in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 37, p. 13554–13559, 2004.
- KIROV, I. et al. An easy “steamDrop” method for high quality plant chromosome preparation. **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.
- KURSAR, T.A.; DEXTER, K.G.; LOKVAM, J.; PENNINGTON, R.T.; RICHARDSON, J.E.; WEBER, M.G.; Et al. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. **Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.** 106,18073–18078. 2009. doi:10.1073/pnas.0904786106.
- LAVIN, M.; HERENDEEN P.S.; WOJICIECHOWSKI, M.F. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the terciary. **Syst. Biol.** 54(4): 575-594. 2005.
- LEWIS, G. P.; RICO ARCE, L. Tribe Ingeae. In: LEWIS, G. et al. (Eds.). . **Legumes of the World**. i ed. [s.l.] Royal Botanic Gardens, 2005. p. 193–213.
- LUCKOW, M., MILLER, J., MURPHY, D.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. In: Klitgaard, B. B. & Bruneau, A. (Eds.). *Advances in Legume Systematics, part 10, Higher level systematics: 197-220.* Macqueen D.J. & H.M. Hernandez. 1997. A Revision of *Calliandra* Series *Racemosae* (Leguminosae: Mimosoideae). *Kew Bull.* 52(1). 2003.
- MACHADO, A. H.; MORTIMER, E. F. **Qímica**. São Paulo: Scipione, 2005.
- MANDAKOVA, T.; LYSAK, M. A. Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). **the Plant Cell Online**, v. 20, n. 10, p. 2559–2570, 2008.
- MANDÁKOVÁ, T.; LYSAK, M. A. Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 42, p. 55–65, 2018.
- MARINHO MAO, SOUZA G, FELIX LP, DE CARVALHO R. Comparative cytogenetics of the ACPT clade (Anacampserotaceae, Cactaceae, Portulacaceae, and Talinaceae): a very diverse group of the suborder Cactineae, Caryophyllales. **Protoplasma**. doi: 10.1007/s00709-018-01334-2. 2019.
- MILLER, J.T., GRIMES, J.W., MURPHY, D.J., BAYER, R.J.; LADIGES, P.Y. A phylogenetic analysis of Acacieae and Ingeae (Fabaceae: Mimosoideae) based on trnK, matK, psbA, trnH, and trnL/trnF sequence data. **Syst. Bot.** 28(3):558-566. 2003.
- MOURAS, A. et al. Localization by in situ hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 207, n. 2–3, p. 204–209, 1987.
- MOURAS, A.; SALETTES, G.; LUTZ, A. Sur L’Utilisation des Protoplastes en Cytologie:

- Amelioration D'Une Methode Recente en vue de L'Identification des Chromosomes Mitotiques des Genres *Nicotiana* et *Prunus*. **Caryologia**, v. 31, n. 1, p. 117–127, 1978.
- MURATA, M. Staining air dried protoplasts for study of plant chromosomes. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 58, n. 2, p. 101–106, 1983.
- NICHOLLS JA, PENNINGTON RT, KOENEN EJM, HUGHES CE, HEARN J, BUNNEFELD L, DEXTER KG, STONE GN AND KIDNER CA. Using targeted enrichment of nuclear genes to increase phylogenetic resolution in the neotropical rain forest genus *Inga* (Leguminosae: Mimosoideae). **Front. Plant Sci.** 6:710. 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00710.
- PRENNER, G. Floral ontogeny in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae: Mimosoideae: Ingeae) and its systematic implications. **International Journal of Plant Science**, 165(3): 417-426. 2004.
- PRENNER, G. Anther development, pollen presentation and pollen adhesive of parenchyma origin in *Calliandra angustifolia* (Leguminosae – MimosoideaeIngeae). **Phyton** 45(2): 267-286, Berger. 2005.
- PHILLIPS, R. L.; WANG, A. S. Chromosome analysis. In: K., V. . I. (Ed.). . **Cell Culture and Somatic Cell Cenetfcs of Plants**. New York: Academic Press, 1984. v. 1p. 712–727.
- PIJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A. Giemsa C-banding of potato chromosomes. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, v. 26, n. 4, p. 415–419, 1984.
- PUTTICK, M. N.; CLARK, J.; DONOGHUE, P. C. J. Size is not everything: Rates of genome size evolution, not C-value, correlate with speciation in angiosperms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1820, 2015.
- RAYBURN, A. L.; GOLG, J. R. A procedure for obtaining mitotic chromosomes from maize. **Maydica**, v. 27, n. January 1982, p. 113–121, 1982.
- ROTHFELS, K. H.; SIMINOVITCH, L. AN AIR-DRYING TECHNIQUE FOR FLATTENING CHROMOSSOMES IN MAMMALIAN CELLS GROWN IN VITRO. **Stain Technology**, v. 33, n. 2, p. 73–77, 1958.
- SCHULZ-SCHAEFFER, J. **Cytogenetics: Plants, Animals, Humans**. New York: Springer-Verlag, 1980.
- SHARMA, A. K.; SHARMA, A. **Chromosome Techniques: Theory and Praticce**. 3. ed. London: The Butterworth Group, 1980.
- SOUZA, G. et al. Interstitial telomeric sites and Robertsonian translocations in species of *Ipheion* and *Nothoscordum* (Amaryllidaceae). **Genetica**, v. 144, n. 2, p. 157–166, 2016.
- SUGIYAMA, S. et al. Effects of acetic acid treatment on plant chromosome structures analyzed by atomic force microscopy. **Analytical Biochemistry**, v. 324, n. 1, p. 39–44, 2004.

APÊNDICES

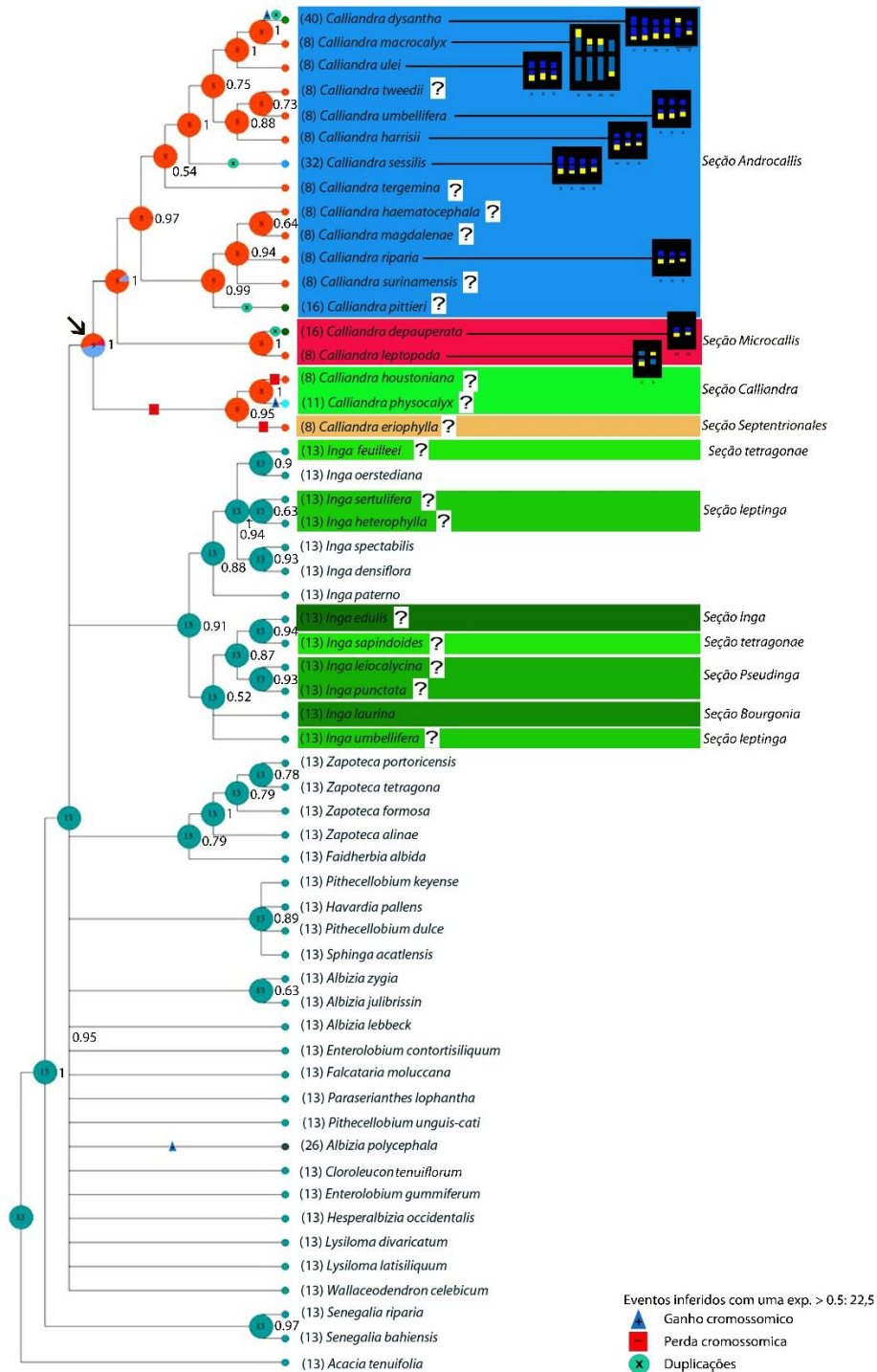


Figura I: Reconstrução do número cromossômico para as espécies da Tribo Ingeae inferida através do ChromEvol 2.0. Gráficos de pizza representam as probabilidades dos números cromossômicos inferidos, onde os números indicam o número cromossômico haploide que apresentam maior probabilidade; As formas geométricas nos ramos indicam os eventos evolutivos que ocorreram; Quadrado = perda (disploidia descendente); triângulo = perda (disploidia descendente) e círculo = duplicação (poliploidia), representam os dois eventos possíveis de acordo com o modelo evolutivo escolhido, inferido com uma expectativa > 0.5. Os idiogramas a direita indicam o número e posição das bandas CMA⁺. A soma dos eventos individuais e o número total de eventos são explicados na inserção.

Tabela 1: Espécies utilizadas na árvore, com o registro do número cromossômico encontrado na literatura par valores de n, 2n e outros citótipo, seguido dos autores. (** = espécies utilizadas como grupo externo), (* = registros de números de bandas CMA+ , dados obtidos na presente pesquisa).

Espécies utilizadas na Árvore	n	2n	Referência	CMA+	
<i>Acacia tenuifolia</i> (L.) Britton & Rose	**	13	E.C.X.R. Santos et al. 2012		
<i>Albizia julibrissin</i> (Roxb.) Prain		13	26	Yeh, M. S., H. YUASA & F. Maekawa. 1986.	
<i>Albizia lebbbeck</i> Benth		13	26	Tixier 1965, Mehra 1976	
<i>Albizia policephala</i> (Benth.) Killip			52	Fedorov, 1974, Atchison 1951, Darlington, 1955	
<i>Albizia zygia</i> (DC.) J.F.Macbr.			26	Cave 1957	
<i>Calliandra depauperata</i> Benth			32	Autor	4*
<i>Calliandra dysantha</i> Benth.			80	Autor	10*
<i>Calliandra eriophylla</i> Benth			16	Maekawa. 1986.	
<i>Calliandra haematocephala</i> Hassk	8	16	Atchison 1951; Kumari. 1979		
<i>Calliandra harrisii</i> (Lindl.) Benth.			16	Autor	6*
<i>Calliandra houstoniana</i> (Mill.) Standl.	8	16	Kumar, 1987; Sunita. 1980.		
<i>Calliandra leptopoda</i> Benth.			16	Autor	4*
<i>Calliandra macrocalyx</i> Harms			16	Autor	8*
<i>Calliandra magdalenae</i> (DC.) Benth		16 (22)	Goldblatt, 1984; Goldblatt & Johnson, 1991;		
<i>Calliandra physocalyx</i> H.Hern & M. Sousa		22	Sánchez. 1988.		
<i>Calliandra pittieri</i> Standl.		32	Shibata 1962; Fedorov, 1974;		
<i>Calliandra riparia</i> Pittier		16	Autor	6*	
<i>Calliandra sessilis</i> Benth.		64	Autor	8*	
<i>Calliandra surinamensis</i> Benth	8	16	Kumar, 1987; Kumari & Sunita, 1980		
<i>Calliandra tergemina</i> (L.) Benth		16	Hernández, 1986		
<i>Calliandra tweedii</i> Benth.		16	Kumari. 1979; Bir & Kumari 1978.		
<i>Calliandra ulei</i> Harms		16	Autor	6*	
<i>Calliandra umbellifera</i> Benth		16	Autor	6*	
<i>Cloroleucon tenuiflorum</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes		26	Fedorov, 1974; Darlington, 1955		
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong		26	Cannon, 2015 Darlington, 1955		
<i>Enterolobium gummiferum</i> (Mart.) J.F.Macbr.		26	BANDEL 1974.		
<i>Falcataria moluccana</i> (Miq.) Barneby & J.W.Grimes		26	Huang. 1989		

<i>Hesperalbizia occidentalis</i> (Brandege) Barneby & J.W.Grime		26	Rico 1992.
<i>Inga densiflora</i> Benth		26	Hanson, 1995.
<i>Inga edulis</i> Mart		26	Shibata, 1962; Hanson, 1995.
<i>Inga feuilleei</i> DC.	13		Teppner, 1998; Shibata 1962.
<i>Inga heterophylla</i> Willd		26	Hanson, L. 1995
<i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd		*26 (52)	*Autor, Hanson, 1995.
<i>Inga leiocalycina</i> Benth		26	Hanson, 1995.
<i>Inga oerstediana</i> Benth		26	Hanson, 1995.
<i>Inga paterno</i> Harms		26	Hanson, 1995.
<i>Inga punctata</i> Willd		26	Hanson, 1995.
<i>Inga sapindoides</i> Willd.		26	Hanson, 1995
<i>Inga sertulifera</i> DC.		26	Hanson, 1995.
<i>Inga spectabilis</i> (Vahl.) Willd.		26	Hanson, 1995.
<i>Inga umbellifera</i> (Vahl) DC.		26	Hanson, 1995
<i>Lysiloma divaricatum</i> (Jacq.) J.F.Macbr.		26	Darlington, 1955
<i>Lysiloma latisiliquum</i> (L.) Benth.		26	Jarolimova. 1994.
<i>Paraserianthes lophantha</i> (Willd.) I.C.Nielsen		26	Kumar, 1987 ; Fedorov, 1974
<i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth	13	26	Cannon, 2015, Kumar, 1987
<i>Pithecellobium unguis-cati</i> (L.) Benth		26	Maekawa. 1986
<i>Senegalia bahiensis</i> ((Benth) Seigler & Ebinger	** 13		E.C.X.R. Santos et al. 2012
<i>Senegalia riparia</i> (Kunth) Britton & Rose	** 13		E.C.X.R. Santos et al. 2012
<i>Shinga acatlensis</i> (Benth.) Barneby & J.W.Grimes	13	26	Rico 1992, Cannon, 2015
<i>Wallaceodendron celebicum</i> Koord.	13	26	Cannon 2015, Goldblatt 1981
<i>Zapoteca alinae</i> H.M.Hern.	13	26	Cannon, 2015; Hernández 1989.
<i>Zapoteca formosa</i> (Kunth) H.M.Hern.		26	Hernández,1986
<i>Zapoteca portoricensis</i> (Jacq.) H.M.Hern.	22	26	Husaini. 1982; Hernández 1989.
<i>Zapoteca tetragona</i> (Willd.) H. Hern.		26	Hernández 1989

