

Sys 318433

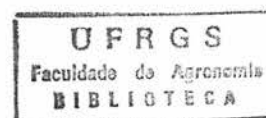
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**Comportamento meiótico e fertilidade do pólen em  
espécies de *Leucaena* Bentham  
(Leguminosae/Mimosoideae)**

Tatiana Boff  
Bióloga (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção  
do Grau de Mestre em Zootecnia

Porto Alegre (RS), Brasil  
Fevereiro de 2002.



TATIANA BOFF  
Bióloga - UFRGS

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **MESTRE EM ZOOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

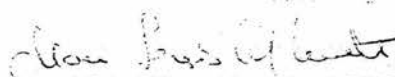
Faculdade de Agronomia

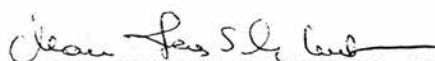
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

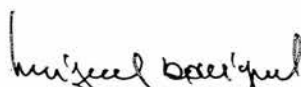
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 20.02.2002  
Pela Banca Examinadora

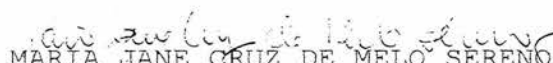
Homologado em: 05.03.2002  
Por


  
MARIA TERESA SCHIFINO-WITTMANN  
Orientadora-PPG-Zootecnia

  
MARIA TERESA SCHIFINO-WITTMANN  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia

  
MIGUEL DALL'AGNOL  
PPG-Zootecnia

  
SOLANGE BOSIO TEDESCO  
UNIFRA

  
MARIA JANE CRUZ DE MELO SERENO  
PPG-Fitotecnia

  
GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realização deste curso e ao CNPq pela bolsa de estudos.

À Professora Maria Teresa Schifino-Wittmann, pela amizade, confiança, orientação e, principalmente, por ter me feito acreditar que a realização deste trabalho era possível.

Ao Professor Miguel Dall'Agnol, pelo incentivo.

Ao Paulo pela ajuda na identificação das espécies na EEA-UFRGS.

Aos colegas do laboratório de Citogenética pelo companherismo e amizade, em especial, Carine, Fabiana, Letícia, Paula, Elaine, Doriane, Daniel e Hardi.

Ao Secretário do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia, Rogério, pelo auxílio prestado durante estes anos.

Aos meus pais, Osvaldo e Ivone, e à minha irmã, Jéssica, pelo amor e incentivo constante.

Ao Luciano, pelo amor, companherismo e paciência.

E, a todos aqueles que, de algum modo contribuíram, para o desenvolvimento deste trabalho.

# COMPORTAMENTO MEIÓTICO E FERTILIDADE DO PÓLEN EM ESPÉCIES DE *LEUCAENA* BENTHAM (LEGUMINOSAE/MIMOSOIDEAE)<sup>1</sup>

Autora: Tatiana Boff

Orientadora: Maria Teresa Schifino-Wittmann

## RESUMO

Comportamento meiótico e fertilidade do pólen foram estudados em um total de 49 acessos de 14 taxa do gênero *Leucaena*, leguminosas arbóreas fixadoras de nitrogênio nativas da América Central. As diplóides *L. macrophylla*, *L. pulverulenta*, *L. retusa*, *L. salvadorensis*, *L. shannonii* e *L. trichandra* apresentaram pareamento cromossômico regular, preferencialmente em bivalentes, mas quadrivalentes e outras anormalidades foram observados em frequências variadas. Nas tetraplóides *L. confertiflora*, *L. diversifolia*, *L. involucrata*, *L. leucocephala*, *L. pallida* e no híbrido *L. x spontanea* a associação cromossômica mais comum também foram bivalentes, mas quadrivalentes e outras anormalidades foram observadas em frequências variadas. O acesso *L. ? hybrid* apresentou predominantemente várias irregularidades, como univalentes, multivalentes e aderências cromossômicas. Nas espécies diplóides a ocorrência de quadrivalentes pode apoiar sua origem paleopoliploide. A presença de quadrivalentes nas espécies poliploides apóia uma origem alotetraploide "segmentar", mas a autopoliploidia com subsequente diploidização não pode ser totalmente descartada. O índice meiótico foi superior a 80% na maioria dos acessos, refletindo a regularidade meiótica. A fertilidade do pólen variou de 71 a 98%, com algumas exceções. A presença de até 19% de díades e tríades e de macropólen em espécies diplóides e tetraplóides (até de 7% em *L. trichandra*) demonstram que gametas não reduzidos não são raros em *Leucaena*. Estes resultados apresentam pela primeira vez uma análise meiótica detalhada e abrangente para *Leucaena* e demonstram como a citogenética clássica pode fornecer dados importantes para estudos taxonômicos, evolutivos e no melhoramento de plantas.

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (160p). Fevereiro, 2002.

# MEIOTIC BEHAVIOR AND POLLEN FERTILITY IN SPECIES OF *LEUCAENA* BENTHAM (LEGUMINOSAE/MIMOSOIDEAE)<sup>1</sup>

Author: Tatiana Boff

Adviser: Maria Teresa Schifino-Wittmann

## ABSTRACT

Meiotic behavior and pollen fertility were studied in a total of 49 accessions of 14 taxa of the Central American nitrogen fixing multipurpose tree genus *Leucaena*. The diploid *L. macrophylla*, *L. pulverulenta*, *L. retusa*, *L. salvadorensis*, *L. shannonii* and *L. trichandra* presented regular chromosome pairing, mostly in bivalents, but quadrivalents and other abnormalities were observed in varying frequencies. In tetraploid *L. confertiflora*, *L. diversifolia*, *L. involucreta*, *L. leucocephala*, *L. pallida* and the hybrid *L. x spontanea* bivalents were also the most common chromosome associations, but quadrivalents and others abnormalities were observed in varying frequencies. The *L. ? hybrid* accession presented a predominance of several irregularities, such as univalents, multivalents and chromosome stickiness. In diploid species the common occurrence of quadrivalents could support their paleopolyploid origin. The presence of quadrivalents in polyploid species supports a segmental allotetraploid origin, but autopolyploidy with subsequent diploidization cannot be ruled out. Meiotic indexes were mostly over 80% reflecting the rather regular meiotic behavior. Pollen fertility ranged from 71 to 98%, with some exceptions. The presence of up to 19% dyads and triads and of "giant" pollen grains in diploid and tetraploid species (up to 7% in *L. trichandra*) shows that unreduced gametes are not uncommon in *Leucaena*. These results present for the first time a detailed and comprehensive meiotic analysis for these *Leucaena* species and show how classical cytogenetics may generate important data to be used in taxonomy, evolutionary studies and plant breeding.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (160p). February, 2002.

## SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Citogenética e melhoramento – considerações gerais .....	3
2.2. O gênero <i>Leucaena</i> .....	8
2.2.1. Utilização de <i>Leucaena</i> .....	8
2.2.2. Origem e distribuição.....	10
2.2.3. Sistemática e Taxonomia de <i>Leucaena</i> .....	12
2.2.4. Citogenética.....	17
2.2.4.1. Número cromossômico e meiose.....	17
2.2.4.2. Espécies tetraplóides: possíveis origens .....	27
2.2.5. Modos de reprodução e hibridação .....	30
2.2.6. Estudos com <i>Leucaena</i> no Departamento de Plantas Forrageiras Agrometeorologia da UFRGS .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1. Material Utilizado .....	35
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Coleta, Fixação e Estocagem do Material .....	35
3.2.2. Preparo das lâminas .....	39
3.2.3. Análise do comportamento meiótico.....	41
3.2.4. Estudos das tétrades .....	42
3.2.5. Estudos dos grãos de pólen .....	42
3.2.6. Análise dos dados .....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1. Comportamento meiótico.....	44
4.1.1. Comportamento meiótico das espécies diplóides.....	45
4.1.2. Comportamento meiótico das espécies tetraplóides e híbrido.....	60
4.2. Índice meiótico.....	89
4.3. Grãos de pólen.....	95
4.4. Análise conjunta da meiose das espécies diplóides analisadas de <i>Leucaena</i> e considerações sobre implicações evolutivas.....	100
5. CONCLUSÕES .....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	111
7. APÊNDICES.....	119
8. VITA.....	160

## RELAÇÃO DAS TABELAS

	Página
1. Relação das espécies do gênero <i>Leucaena</i> com base na classificação atual de Hughes (1998a).....	15
2. Números cromossômicos de <i>Leucaena</i> determinados por Schifino-Wittmann <i>et al.</i> (2000b) e Cardoso <i>et al.</i> (2000).....	25
3. Relação do material utilizado analisado neste experimento.....	36
4. Comportamento meiótico em acessos e espécies de <i>Leucaena</i> .....	46
5. Determinação do índice meiótico em espécies e acessos de <i>Leucaena</i> .....	90
6. Estimativa da fertilidade do pólen em espécies e acessos de <i>Leucaena</i> .....	96
7. Síntese comparativa dos dados citogenéticos para as espécies de <i>Leucaena</i> analisadas.....	101

## RELAÇÃO DAS FIGURAS

	Página
1. Detalhe da inflorescência de <i>L. retusa</i> .....	11
2. Aspecto geral de espécies de <i>Leucaena</i> no campo.....	11
3. População de <i>Leucaena</i> na EEA-UFRGS.....	38
4. Inflorescências de <i>Leucaena</i> – fases de desenvolvimento.....	38
5. Inflorescências fixadas e estocadas em álcool 70%. ....	40
6. Separação das estruturas desejadas para preparação da lâmina ....	40
7. Metáfases I de <i>L. macrophylla</i> 55/88 (a) seta indicando multivalente (b) irregularidades como multivalentes (seta maior) e separação precoce de cromátides (seta menor).....	50
8. <i>L. macrophylla</i> 55/88 (a) metáfase I (b) diacinese, demonstrando as associações quadrivalentes (setas).....	51
9. Células meióticas de <i>L. pulverulenta</i> (a) metáfase I do acesso 84/87 apresentando separação precoce de cromátides (seta) (b) metáfase II do acesso 83/87.....	53
10. <i>L. retusa</i> 23/86 (a) metáfase I (b) diacinese. ....	54
11. Metáfase I de <i>L. salvadorensis</i> apresentando multivalente (seta)....	55
12. <i>L. shannonii</i> 26/84 (a) metáfase I, apresentando multivalentes (seta), (b) telófase I, com cromossomos retardatários (setas).....	57
13. Metáfases I irregulares de <i>L. shannonii</i> 141/92, apresentando multivalentes e outras associações não identificadas (setas).....	58
14. Anáfases I irregulares de <i>L. shannonii</i> (a) acesso 141/92 (b) acesso 135/92. ....	59
15. Paquitenos de <i>L. trichandra</i> 138/92.....	61
16. Metáfases I de <i>L. trichandra</i> apresentando irregularidades como associações múltiplas (setas) (a) acesso 35/88 (b) acesso 138/92. ....	62
17. <i>L. trichandra</i> 131/92 (a) diacinese, apresentando 2 nucléolos b) metáfase II.....	63
18. <i>L. confertiflora</i> 119/92. (a) e (b) mostram metáfases I, com sobreposição dos cromossomos e citoplasma gorduroso.....	65



	Página
19. <i>L. diversifolia</i> 45/87 (a) diacinese (b) metáfase I, apresentando somente bivalentes. ....	66
20. <i>L. diversifolia</i> 83/92 (a) metáfase I (b) diacinese.....	67
21. <i>L. diversifolia</i> 82/92 (a) diacinese (b) prófase II.....	68
22. Metáfases I regulares de <i>L. diversifolia</i> 105/94.....	69
23. <i>L. diversifolia</i> (a) acesso 01/90 - metáfase I (b) 106/94 diacinese...	70
24. <i>L. involucrata</i> 87/92 (a) anáfase I regular (b) metáfase I regular.....	72
25. <i>L. involucrata</i> 87/92 (a) diacinese (b) metáfase I.....	73
26. Metáfases II de <i>L. i. glabrata</i> 34/92. ....	76
27. <i>L. i. glabrata</i> 32/88 (a) telófase II (b) diacinese. ....	77
28. Metáfases I de <i>L. i. glabrata</i> 32/88 com associações multivalentes (setas).....	78
29. Metáfases I de <i>L. i. glabrata</i> 19/81 (a) quadrivalentes típicos (setas) (b) várias irregularidades (seta).....	79
30. Metáfases I de <i>L. i. glabrata</i> (a) acesso 19/81 (b) acesso 145/91....	80
31. Metáfases I regulares de <i>L. i. glabrata</i> 92/92. ....	81
32. Metáfases de <i>L. pallida</i> 78/92.....	82
33. Diacinese de <i>L. pallida</i> 79/92. ....	83
34. <i>L. x spontanea</i> 98/94 (a) diacinese (b) anáfase I regular. ....	84
35. Metáfases I de <i>L. x spontanea</i> 98/94 irregulares apresentando (a) multivalentes (setas) (b) separação precoce de cromátides (seta)...	85
36. Metáfases de <i>L. ? hybrid</i> demonstrando algumas associações (setas).....	86
37. Diacinese de <i>L. ? hybrid</i> demonstrando possível separação dos genomas.....	87
38. Diacinese de <i>L. ? hybrid</i> demonstrando a fissão dos nucléolos.....	88
39. Tétrades normais de <i>L. leucocephala glabrata</i> 145/91.....	92
40. Tétrade de <i>L. lanceolata</i> 43/85.....	92
41. Díade de <i>L. trichandra</i> 138/92. ....	93
42. Tétrade com mais de 4 micrósporos em <i>L. pallida</i> 78/92.....	93
43. Grãos de pólen de <i>L. i. glabrata</i> 32/88: viável e inviável. ....	98
44. Macropólen (seta) de <i>L. trichandra</i> 35/88. ....	98

## 1. INTRODUÇÃO

A caracterização de germoplasma através de estudos reprodutivos, fenológicos, citogenéticos e morfológicos, entre outros, é essencial para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético assim como para taxonomia e genética. Neste sentido, a citogenética tem um papel importantíssimo.

Entre as inúmeras informações geradas pelos estudos citogenéticos, as mais relevantes para o melhoramento de plantas, são nível de ploidia, número cromossômico, regularidade do comportamento meiótico e fertilidade dos gametas. A citogenética também fornece informações importantes à taxonomia e para estudos evolutivos.

O gênero *Leucaena* Bentham (Leguminosae/Mimosoideae) é nativo da América Central e compreende 22 espécies de árvores e arbustos fixadores de nitrogênio. A maioria das espécies são árvores de múltiplas utilidades, que podem ser exploradas para produção de forragem, produção de alimento, adubo verde, produção de madeira, controle da erosão.

Como leguminosas forrageiras, as espécies de *Leucaena* podem ser utilizadas em sistemas silvopastoris trazendo inúmeros benefícios, entre eles pode-se citar a proteção que as árvores fornecem ao solo evitando a erosão, a lixiviação e a compactação. Nos períodos de baixa disponibilidade de alimento,

podem servir como um banco de proteínas permanente para alimentação do gado.

A grande utilização de *Leucaena* ocorre principalmente na região dos trópicos e subtropicais, sendo as espécies mais utilizadas, *L. leucocephala* e, atualmente, *L. diversifolia* e *L. pallida*. Nas regiões de clima temperado e de solos ácidos, a utilização destas espécies é dificultada pela suscetibilidade ao frio e pela sensibilidade a acidez do solo, sendo necessário um processo de seleção para adaptação a estes aspectos.

Tendo em vista a importância econômica e a grande diversidade de germoplasma, *Leucaena* tem sido amplamente estudada, mas poucos são os estudos referentes à citogenética do gênero.

*Leucaena* tem sido estudada citogeneticamente, em trabalhos isolados, desde 1960. Somente em 2000, foi completada a contagem dos números cromossômicos para todas as espécies. No entanto, uma grande lacuna se mantinha quanto ao comportamento meiótico, uma vez que as informações existentes eram para poucas espécies e para algumas populações híbridas.

Portanto, este trabalho teve por objetivo estudar o comportamento meiótico e estimar a fertilidade dos grãos de pólen em uma coleção de germoplasma de espécies de *Leucaena*, visando reunir um conjunto de informações importantes para estudos taxonômicos e evolutivos do gênero, assim como para subsidiar futuros trabalhos de seleção e melhoramento.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Citogenética e melhoramento: considerações gerais**

O melhoramento genético de plantas é a arte e a ciência de melhorar plantas em benefício do homem. Como arte, depende da intuição e das experiências passadas que são únicas de cada indivíduo. Como ciência, o melhoramento depende dos conhecimentos de agronomia, dos princípios da genética e de outras ciências correlatas como a botânica, bioquímica, estatística e fisiologia (Poehiman, 1965).

O sucesso de um programa de melhoramento genético depende, entre outros aspectos, da realização inicial de estudos básicos de caracterização dos recursos genéticos disponíveis. Para que haja melhoramento, é imprescindível que haja variabilidade genética e que se crie um banco de germoplasma. Segundo Miglani (1998), germoplasma é todo o conjunto genético de uma espécie, que em uma coleção (banco de germoplasma) servem como fonte genética a ser utilizada por melhoristas.

A caracterização de germoplasma pode ser realizada de diversas maneiras, como por exemplo, através de análises morfológicas, agronômicas, bioquímicas e genéticas. Dentro da genética, a citogenética é uma ferramenta de grande importância para caracterizar a variabilidade.

A citogenética compreende todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, no que diz respeito à morfologia, organização, função e replicação, bem como na sua variação e evolução (Guerra, 1988).

Segundo Stebbins (1971), as diferenças cromossômicas refletem diferenças na origem da variação genética, e muitas vezes, no conteúdo gênico dos indivíduos.

Singh (1993) considera a citogenética como uma ciência híbrida que combina citologia (estudo dos cromossomos e outros componentes celulares) e genética (estudo da herança) e, que inclui manipulação dos cromossomos (técnicas de coloração cromossômica), função e movimento dos cromossomos (mitose e meiose), número e estrutura dos cromossomos (análise do cariótipo).

Considerada por muito tempo como uma ciência básica e ultrapassada por melhoristas de plantas, a citogenética passou a ser reconhecida após o desenvolvimento, na década de 80, de técnicas sofisticadas como GISH (Genomic *in situ* Hybridization) e FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization), que permitiriam monitorar a transferência de genes de interesse intra e interespecífica (Sybenga, 1998).

Entre as informações geradas pela citogenética, às referentes ao número cromossômico são as mais amplamente conhecidas. Por exemplo, uma listagem atualizada dos números cromossômicos citados na literatura pode ser encontrada no Index Plant Chromosome Number ([http:// mobot.bot.org/w3t/search/ipcn.html](http://mobot.bot.org/w3t/search/ipcn.html)). No entanto, estudos mais detalhados de comportamento meiótico e avaliações de fertilidade de pólen são reduzidos

para a maioria das plantas existentes quando comparadas às plantas de interesse econômico, como o arroz, aveia, centeio, milho e trigo, que tem sido amplamente analisadas citogeneticamente.

De acordo com Hanna (1980) estas informações básicas geradas pela citogenética tem contribuído e continuarão contribuindo diretamente para o melhoramento de plantas.

O conhecimento gerado pela citogenética tem uma importância crucial para um programa de melhoramento: ajuda a selecionar os materiais adequados e a manter uma monitoração constante, revelando possíveis alterações na fertilidade dos indivíduos. De acordo com Sybenga (1998), a citogenética possui duas funções principais no melhoramento de plantas: primeiro, gerar informações e, segundo, fornecer métodos para manipulação genética. As informações citogenéticas importantes ao melhorista, são aquelas já existentes sobre o material que está sendo trabalhado, sobre a metodologia que será utilizada durante o trabalho e, principalmente, as novas informações que irão surgindo ao longo do projeto. Técnicas de manipulação genética, não envolvendo transgenia, como a transferência intra e interespecífica de genes e alterações na dosagem gênica (haploidia, aloploidia, autopoliploidia) envolvem diretamente a citogenética.

A citogenética também possui um papel importante nos estudos evolutivos e taxonômicos. A comparação de características citogenéticas e morfológicas pode, em muitos casos, ser empregada para auxiliar nos problemas de classificação e identificação taxonômicas bem como auxiliar na

compreensão da evolução de determinados grupos (Stuessy, 1990; Schifino-Wittmann, 2000a).

Atualmente, com o desenvolvimento da citogenética molecular, técnicas mais refinadas como a hibridização *in situ*, estão sendo empregadas mais amplamente, permitindo, em muitos casos, identificar alterações cromossômicas e os mecanismos envolvidos nos processos de especiação (Benett *et al.*, 1992; Benett, 1995).

Para espécies arbóreas, as informações citogenéticas são relativamente limitadas quando comparadas às informações existentes para outras culturas de interesse. A diferença básica reside no fato de que em espécies cultivadas, os estudos envolvendo ciclos de mitose e meiose podem ser conduzidos em um curto período (um ano), enquanto que em plantas arbóreas estes estudos são mais limitados devido a longa fase entre os estádios de juvenilidade/maturidade. Um outro problema é o tamanho físico das árvores, que dificulta a condução de estudos que requerem grandes amostras, principalmente no caso de meiose. Pela maior facilidade, os estudos de mitose dominam as pesquisas citogenéticas em arbóreas quando comparados aos estudos meióticos (Schlarbaum, 2000).

As Gimnospermas são o grupo vegetal mais estudado citogeneticamente entre as árvores, principalmente o grupo das coníferas e a família das pináceas. Os estudos em geral visam determinar o número cromossômico e o cariótipo utilizando técnicas convencionais (Muratova, 1997a; Muratova *et al.*, 2000) ou técnicas de citogenética molecular (Lubaretz *et al.*, 1996, Hizume & Kondo, 2000).

Entretanto, muitas outras espécies arbóreas tem sido estudadas como é o caso de *Leucaena* e a maioria dos trabalhos foi realizada com o uso de técnicas convencionais de citogenética, objetivando informações como número cromossômico e comportamento meiótico (González *et al.*, 1967; Pan & Brewbaker, 1988; Freitas *et al.*, 1988;1991; Palomino *et al.*, 1995; Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b). Somente um estudo preliminar foi conduzido utilizando técnicas moleculares com *Leucaena*, que devido aos pequenos cromossomos não são material adequado para execução destas técnicas (Hartman *et al.*, 2000). Outros gêneros como *Prosopis* e *Citrus* tem sido, também, amplamente estudados (Cavaicante *et al.*, 2000).

Schlarbaum (2000) comentou que a descoberta e a confirmação da natureza triplóide de *Populus tremula* por Nielson-Ehie e Muntzing, em 1936, foi em evento marcante para a citogenética de arbóreas, pois caracterizou-se por ser o primeiro exemplo do potencial das informações citogenéticas no melhoramento de arbóreas. Após este estudo, os programas de melhoramento envolvendo a manipulação do nível de ploidia, passaram a classificar os estudos citogenéticos de arbóreas como básicos e aplicados.

Os estudos básicos compreendem descrição do número e morfologia dos cromossomos com coloração convencional, metodologias de bandeamento, estudos meióticos, citotaxonomia e citogenética molecular envolvendo sondas moleculares e mapeamento gênico. Como exemplos citam-se os trabalhos de Muratova (1997b) que estudou os cromossomos nucleolares em algumas espécies de *Pinus* e *Larix*, e Mochalova (1997) que estudou a citogenética de espécies e híbridos de *Prunus* siberianas.



Os estudos aplicados conduzidos com cromossomos buscam detectar genótipos superiores, manipular o nível de ploidia para gerar genótipos superiores e ou anfidiplóides e estudos correlacionando frequências de aberrações cromossômicas com poluição (Schlarbaum, 2000). Borzan *et al.* (1997) utilizaram a citogenética para investigar o nível de ploidia de alguns clones de salgueiro em relação a produção em testes a campo. Butorina *et al.* (1997) verificaram os efeitos da irradiação acidental da usina nuclear de Chernobyl no comportamento citogenético de espécies arbóreas de *Pinus sylvestris*, *Quercus robur* e *Betula pendula*, encontrando uma correlação positiva entre os efeitos da irradiação e as anormalidades citogenéticas.

## **2.2 – O gênero *Leucaena***

### **2.2.1 – Utilização de *Leucaena***

Atualmente a sigla MPTS (Multi Purpose Tree Species – Espécies de Múltiplos Propósitos) é utilizada para designar espécies que se destinam a usos múltiplos, ou seja, que apresentam um potencial de manejo amplo e flexível, como é o caso de *Leucaena*. O cultivo destas espécies é com finalidade comercial, mas pode ser também ecologicamente adequado em um sistema de uso múltiplo da terra. As MPTS são componentes vitais dos sistemas agroflorestais e o sucesso do sistema, como uma opção de uso viável da terra, depende da exploração do potencial destas espécies (Nair, 1993).

Avaliar e identificar espécies de múltiplos usos tem por finalidade selecionar germoplasmas promissores que expressem características vantajosas e que propiciem um aumento de produtividade sem o aumento de

custos. Vários estudos realizados em diferentes partes do mundo visam identificar, selecionar e melhorar espécies de múltiplos usos com a necessidade de aumentar o conhecimento acerca da diversidade genética e do potencial a ser explorado nestas espécies (Nair, 1993).

Espécies do gênero *Leucaena* se encaixam perfeitamente na descrição de MPTS. A importância econômica das espécies de *Leucaena* para a conservação do solo, adubo verde, forragem, alimento humano e produção de pequenos artefatos é bem conhecida e documentada (Brewbaker, 1987b; Shelton & Jones, 1995; Hughes, 1998a). Na América Central, existem evidências de cultivo e transporte pelo homem há mais de 2000 anos (Harris *et al.*, 1996) e, provavelmente de exploração das espécies como fonte de alimento pelos povos indígenas pelo menos nos últimos 700 anos (Hughes, 1998b).

Atualmente, é uma das leguminosas de usos múltiplos mais utilizadas nos sistemas agroflorestais em função da alta qualidade da forragem e do rápido rebrote (Brewbaker e Sorensson, 1994). Por ser uma espécie de dispersão pantropical *L. leucocephala* representa um excelente germoplasma para ser utilizado em programas de melhoramento, uma vez que apresenta uma multiplicidade de usos, crescimento e rebrote rápidos e qualidade excepcional de forragem. Além disto, possui uma grande capacidade de hibridação com algumas outras espécies do gênero, como por exemplo com *L. diversifolia*, formando progênies férteis (Freitas *et al.*, 1988; 1991).

Shelton & Jones (1995) comentaram que pela extensa adaptabilidade ambiental e pela grande variedade de usos demonstrados pelas

espécies, *Leucaena* parece possuir uma combinação de atributos sem paralelo em outras espécies.

### 2.2.2 - Origem e distribuição

*Leucaena* Benth é um gênero americano de árvores e arbustos tropicais e subtropicais de multipropósito (Figura 1 e 2). Compreende 22 espécies, seis taxa infraespecíficos e dois híbridos determinados (Hughes, 1998a).

Todas as espécies são nativas do Novo Mundo, apesar de *L. leucocephala* e, em menor escala, *L. diversifolia* serem atualmente cultivadas pantropicalmente e naturalizadas em muitas áreas (Hughes & Styles, 1989; Hughes, 1998a). Evidências etnobotânicas sugerem que *L. leucocephala* tenha sofrido influência antrópica em sua origem, tendo surgido após o cultivo conjunto de uma ou ambas espécies progenitoras levando à formação de um anfidiplóide (Hughes & Harris, 1995; Harris *et al.*, 1996).

A interferência humana é de grande importância no processo de distribuição das espécies do gênero, principalmente pelos processos de domesticação indígena. A maioria das espécies são cultivadas e suas sementes distribuídas por todo o centro-sul do México. Esta ação antrópica reflete nos níveis de diversidade genética nas populações, que provavelmente apresentam uma considerável diminuição em relação às populações naturais (Hughes *et al.*, 1995). Para *L. leucocephala*, a espécie mais cultivada do gênero, a ação antrópica acarretou um estreitamento da base genética (Harris *et al.*, 1994b).

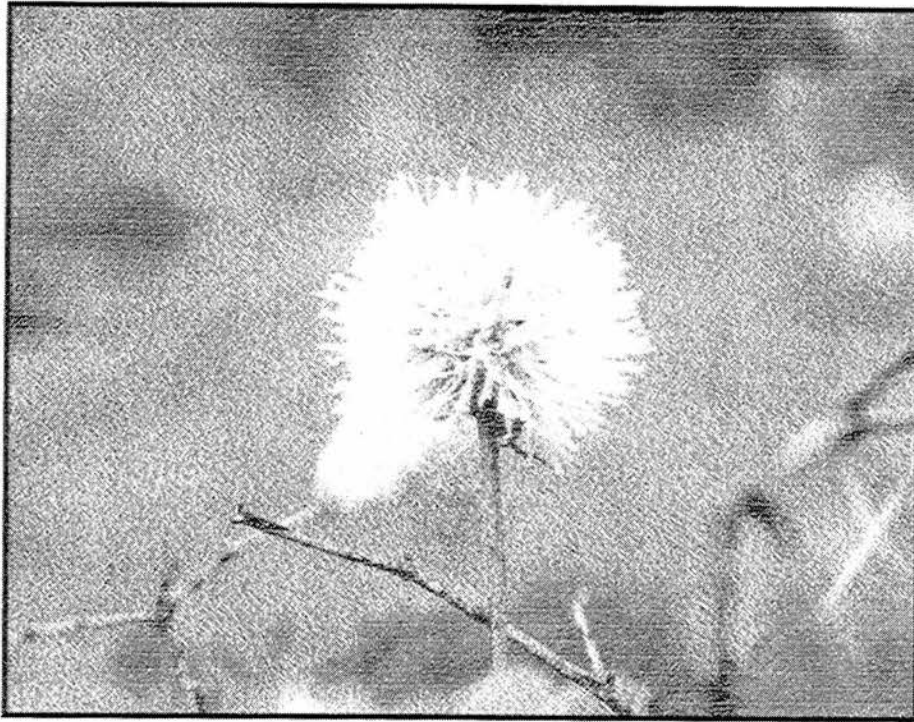


FIGURA 1– Detalhe da inflorescência de *L. retusa*.

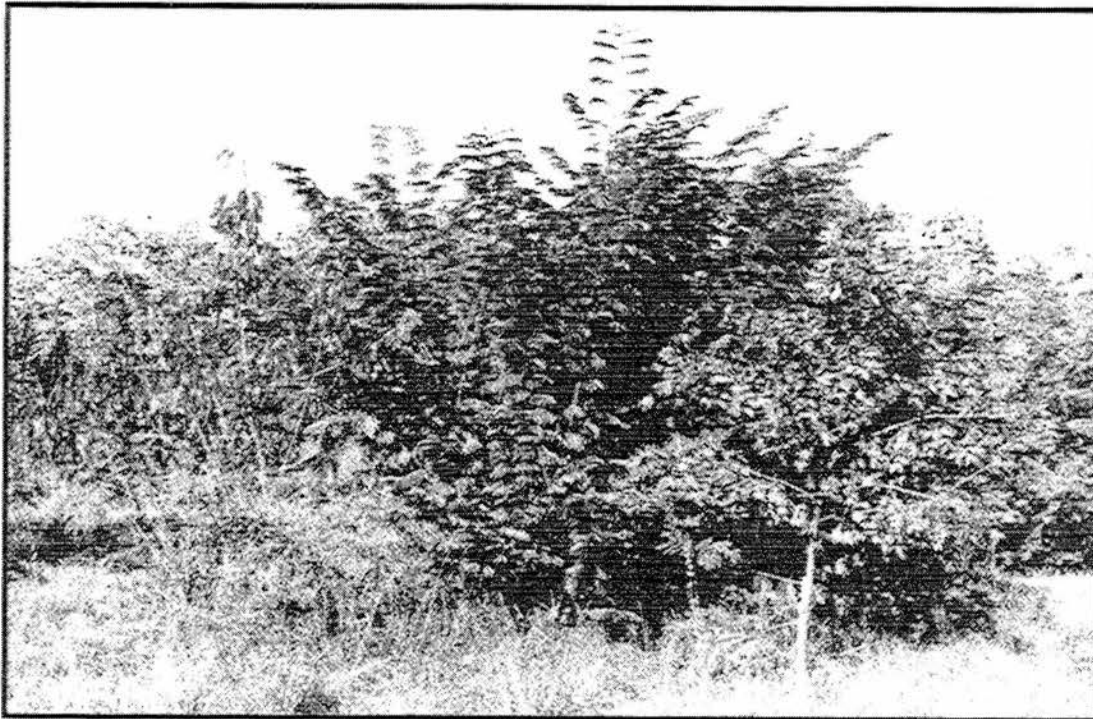


FIGURA 2 – Aspecto geral de espécies de *Leucaena* no campo.

A grande diversidade de espécies está no México (17 espécies, sendo 10 endêmicas) e no norte da América Central (9 espécies, sendo 4 endêmicas). A diversidade decresce progressivamente tanto para o norte quanto para o sul, com duas espécies nativas no Texas (EUA) – *L. pulverulenta* e *L. retusa*, que é o limite norte do gênero e uma no Peru (*L. trichodes*), que é o limite sul (Harris *et al.*, 1994a; Hughes, 1998b).

Conhecidas tipicamente pela formação de árvores de pequeno a médio porte, as espécies de *Leucaena* desenvolvem-se geralmente em florestas tropicais sazonalmente secas, e com menor frequência, em habitats subtropicais frio ou temperado. Distribuem-se entre os 40° de latitude Norte aproximadamente e os 2500 metros de altitude. Esta amplitude geográfica indica a diversidade de climas e de regimes de temperatura, aos quais estas espécies estão submetidas (Hughes, 1998a).

### **2.2.3– Sistemática e taxonomia de *Leucaena***

Sistemática e taxonomia são dois termos que podem ser intercambiados, pois são utilizados para se referir à ciência da descoberta, descrição, biologia comparativa e classificação das espécies. A taxonomia avalia a organização e a história da diversidade, fornecendo dados de quantas espécies existem, onde estas espécies ocorrem, que características elas possuem, enquanto que a sistemática investiga como elas estão relacionadas (Hughes, 1998a e c).

Para *Leucaena*, a taxonomia assume um papel extremamente importante, uma vez que um claro conhecimento, documentação e preservação

da diversidade das espécies, principalmente dos parentes selvagens das espécies cultivadas, mantêm uma fonte de diversidade genética.

A história taxonômica de *Leucaena* é bastante controversa e complexa, no que diz respeito ao número de espécies já estabelecido – variando de 10 a 39 . Esta complexidade está relacionada a diversos fatores que dificultam a delimitação das espécies como a grande diversidade presente no gênero, a interferência humana no processo de domesticação, a presença de poliploidia e as diferentes abordagens utilizadas para delimitar as espécies (Zarate, 1994; Harris, 1995; Hughes, 1998b).

O gênero *Leucaena* foi primeiramente descrito por Bentham em 1842, que estabeleceu quatro espécies e, posteriormente seis em 1846, e nove espécies em 1875. Depois de Bentham, Britton e Rose, Brewbaker, Zarate, Harris e Hughes estudaram a taxonomia do gênero e propuseram suas classificações, cada um com diferentes abordagens para a delimitação das espécies.

Após a revisão de Bentham, em 1975, diversas explorações a campo levaram a descrição de novas supostas espécies, o que levou à revisão feita por Standley em 1922, que reconheceu 15 espécies.

Britton e Rose (1928), propuseram 39 espécies para o gênero, baseados em caracteres quantitativos para delimitação das espécies (folha, foliólulos, pilosidade, dimensões da vagem, por exemplo). No entanto, estas características utilizadas são insuficientes para delimitar espécies, uma vez que apresentam um padrão de variação contínuo entre as espécies e populações da mesma espécie.

Brewbaker realizou a primeira tentativa de diminuir este número de espécies, utilizando a observação do material em cultivo e a hibridação interespecífica para delimitação das espécies. Estes estudos reduziram o número de 39 para 10 (Brewbaker, 1987a) e, à medida que novas espécies eram observadas, este número aumentou gradualmente para 16.

Zarate (1994), trabalhando com espécies mexicanas, utilizou o nível subespecífico para delimitar as espécies. Segundo o autor, a utilização deste critério se justifica devido "a uma freqüente ocorrência de hibridação interespecífica e especiação incipiente, do tipo alopátrica, em *Leucaena*", atribuída a complexa história biogeográfica da região.

Zarate (1994), sugeriu a divisão do gênero em duas grandes secções: *Macrophylla* e *Leucaena*. A seção *Macrophylla*, compreende espécies com folhas grandes e poucos folíolos por folha, sendo a espécie típica *L. macrophylla*. A seção *Leucaena*, tipificada por *L. leucocephala*, compreende as espécies com folíolos pequenos e muitos folíolos por folha.

Harris *et al.* (1994a) propuseram a primeira hipótese de classificação baseada na análise de DNA de cloroplasto (cpDNA) para delimitar as espécies. O DNA de cloroplasto é herdado maternalmente em *Leucaena* e permite inferir sobre as relações entre espécies, a origem das espécies poliplóides e o parentesco entre os híbridos. A partir da análise dos dados de cpDNA o gênero ficou dividido em três grandes grupos.

Hughes (1998b) estabeleceu as relações entre as espécies através da análise cladística de 29 caracteres morfológicos, propondo 22 espécies, seis taxa infraespecífico e dois híbridos interespecíficos (Tabela 1).

TABELA 1 – Relação das espécies do gênero *Leucaena* com base na classificação atual de Hughes (1998a).

Espécies reconhecidas e autores	Taxa infraespecíficos reconhecidos	Sinônimos
<i>L. collinsii</i> Britton & Rose	subsp. <i>collinsii</i> subsp. <i>zacapana</i> C. E. Hughes	<i>L. esculenta</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Benth. subsp. <i>collinsii</i> (Britton & Rose) S. Zárate
<i>L. confertiflora</i> S. Zárate	var. <i>confertiflora</i> var. <i>adenotheloidea</i> (S. Zárate) C. E. Hughes	<i>L. confertiflora</i> S. Zárate subsp. <i>adenotheloidea</i> S. Zárate
<i>L. cuspidata</i> Standley		<i>L. cuspidata</i> Standley subsp. <i>jacalensis</i> S. Zárate
<i>L. diversifolia</i> (Schltdl.) Benth.		<i>L. diversifolia</i> (Schltdl.) Benth. subsp. <i>diversifolia sensu</i> Pan (1988) <i>L. brachycarpa</i> Urban <i>L. laxifolia</i> Urban
<i>L. esculenta</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Benth.		<i>L. confusa</i> Britton & Rose <i>L. doylei</i> Britton & Rose
<i>L. greggii</i> S. Watson		
<i>L. involucrata</i> S. Zárate		
<i>L. lanceolata</i> S. Watson	var. <i>lanceolata</i>  var. <i>sousae</i> (S. Zárate) C. E. Hughes	<i>L. microcarpa</i> Rose <i>L. brandegeei</i> Britton & Rose <i>L. cruziana</i> Britton & Rose <i>L. palmeri</i> Britton & Rose <i>L. pubescens</i> Britton & Rose <i>L. purpusii</i> Britton & Rose <i>L. sinaloensis</i> Britton & Rose <i>L. sonorensis</i> Britton & Rose <i>L. nitens</i> M. E. Jones <i>L. lanceolata</i> S. Watson subsp. <i>sousae</i> S. Zárate
<i>L. lempirana</i> C. E. Hughes		
<i>L. leucocephala</i> (Lam) de Wit.	subsp. <i>leucocephala</i>  subsp. <i>glabrata</i> (Rose) S. Zárate	<i>L. glauca</i> (Willd.) Benth. <i>L. latisiliqua sensu</i> Gillis & Steam
<i>L. leucocephala</i> (Lam) de Wit.	subsp. <i>ixtahuacana</i> C. E. Hughes	
<i>L. macrophylla</i> Benth.	subsp. <i>macrophylla</i>  subsp. <i>istmensis</i> C. E. Hughes	<i>L. macrocarpa</i> Rose <i>L. houghii</i> Britton & Rose <i>L. nelsonii</i> Britton & Rose <i>L. macrophylla</i> Benth. subsp. <i>nelsonii</i> (Britton & Rose) S. Zárate
<i>L. magnifica</i> (C. E. Hughes) C. E. Hughes		<i>L. shannonii</i> J.D. Smith subsp. <i>magnifica</i> C. E. Hughes
<i>L. matudae</i> (S. Zárate) C. E. Hughes		<i>L. esculenta</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Benth. subsp. <i>matudae</i>



TABELA 1 – Continuação.

Espécies reconhecidas e autores	Taxa infraespecíficos reconhecidos	Sinônimos
<i>L. multicapitulata</i> Schery		
<i>L. pallida</i> Britton & Rose		<i>L. dugesiana</i> Britton & Rose <i>L. oaxacana</i> Britton & Rose <i>L. paniculata</i> Britton & Rose <i>L. esculenta</i> (Sessé & Moc. ex DC.) Benth. subsp. <i>paniculata</i> (Britton & Rose) S. Zárate
<i>L. pueblana</i> Britton & Rose		
<i>L. pulverulenta</i> (Schltdl.) Benth.		
<i>L. retusa</i> Benth.		<i>Acacia sabeana</i> Buchley
<i>L. salvadorensis</i> Standley ex Britton & Rose		
<i>L. shannonii</i> J.D. Smith		
<i>L. trichandra</i> (Zucc.) Urban		<i>L. stenocarpa</i> Urban <i>L. diversifolia</i> (Schltdl.) Benth. subsp. <i>stenocarpa</i> (Urban) S. Zárate <i>L. guatemalensis</i> Britton & Rose <i>L. revoluta</i> Britton & Rose <i>L. standleyi</i> Britton & Rose <i>Acacia albanensis</i> Britton & Rose
<i>L. trichodes</i> (Jacq.) Benth.		<i>L. canescens</i> Benth. <i>L. pseudotrichodes</i> (DC.) Britton & Rose <i>L. colombiana</i> Britton & Killip <i>L. bolivarensis</i> Britton & Killip <i>L. trichodes</i> (Jacq.) Benth. var. <i>acutifolia</i> Macbride

Para delimitar as espécies Hughes (1998b), utilizou o conceito filogenético de espécie, onde as características e estados de características são definidos com base na variação quantitativa da morfologia e as espécies são diferenciadas quando apresentam combinações únicas ou constantes dessas características ou estados de características.

Para diferenciar subespécies e variedades, foram utilizados caracteres quantitativos (variação nas folhas e vagens) que apresentam uma variação contínua dentro e entre as espécies e não servem como uma base clara para delimitar espécies, mas são bem apropriados para delimitações em nível infraespecífico. Segundo Hughes (1998c), a classificação subespécie foi utilizada quando as entidades eram distinguidas por características correlacionadas com a geografia, enquanto que variedade foi utilizada quando as entidades eram distinguidas por características não correlacionadas com a geografia, ou quando os limites geográficos das variantes são pouco conhecidos. Atualmente, a classificação proposta por Hughes (1998b), é a mais amplamente aceita.

## **2.2.4 – Citogenética**

### **2.2.4.1 – Número cromossômico e meiose**

Apesar da importância econômica do gênero, os estudos citogenéticos em *Leucaena* não são muito frequentes, já que o pequeno tamanho (ca. 1 $\mu$ m) e o grande número (52-112) dos cromossomos não são fatores estimulantes.

Os primeiros relatos referentes à citogenética do gênero datam das décadas de 30 e 40, com informações sobre o número cromossômico de poucas espécies (Tjio, 1948). Atualmente, são conhecidos dois números cromossômicos básicos ( $x=26$  e  $x=28$ ) e dois níveis de ploidia – diplóide e tetraplóide – e dentro de cada nível há dois números cromossômicos básicos:  $2n=2x=52$ ;  $2n=2x=56$ ;  $2n=4x=104$ ,  $2n=4x=112$  (Gonzales *et al.*, 1967; Hutton, 1981; Pan & Brewbaker, 1988; Freitas *et al.*, 1991; Sorensson & Brewbaker, 1994; Palomino *et al.*, 1995, Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b).

A maioria das espécies de *Leucaena* é diplóide, sendo reconhecidas cinco espécies tetraplóides e uma delas, *L. involucrata*, tendo sido recentemente identificada (Hughes, 1998b; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b).

Gonzales *et al.* (1967) realizaram estudos citogenéticos em *Leucaena* encontrando para *L. lanceolata*, *L. trichodes* e “*L. stenocarpa*”,  $2n=2x=52$ ; para *L. leucocephala*, *L. glabrata* e *L. esculenta*  $2n=4x=104$ ; *L. pulverulenta*  $2n=2x=56$ ; *L. pulverulenta* x *L. leucocephala*,  $2n=80$ . Avaliando a meiose, relataram comportamento meiótico regular para cinco das espécies estudadas, sendo que *L. trichodes* e “*L. stenocarpa*” não foram analisadas; e para o híbrido entre *L. pulverulenta* x *L. leucocephala*, foi verificada a presença de 26 bivalentes (II) e 28 univalentes (I).

Pan & Brewbaker (1988), analisaram a citologia de 11 espécies e uma subespécie e discutiram as relações filogenéticas e o modo de especiação no gênero. As análises indicaram que seis espécies e uma subespécie apresentaram  $n=26$  (número gamético), sendo consideradas diplóides. Entre

as espécies encontram-se *L. esculenta*, *L. lanceolata*, *L. macrophylla*, *L. shannonii*, *L. trichodes* e *L. diversifolia* ssp. *trichandra*. Excepto para *L. lanceolata*, para todas as espécies os números cromossômicos somáticos representaram contagens originais. *L. collinsii* apresentou  $n=26$  diferindo do número encontrado por Hutton (1981)  $n=52$ . Neste caso, os autores sugeriram que a árvore analisada era um híbrido ou que ocorreu um erro de análise. *L. retusa* e *L. pulverulenta* apresentaram  $n=28$ , sendo este número único no gênero. *L. diversifolia* ssp. *diversifolia*, *L. leucocephala* e *L. pallida* apresentaram  $n=52$ , sendo consideradas espécies tetraplóides.

Quanto às análises meióticas, Pan & Brewbaker (1988), relataram que todas as espécies analisadas (diplóides e tetraplóides) – apresentaram meiose regular com formação de bivalentes em metáfase I e segregação normal. Os autores sugerem que esta natureza meiótica regular nas espécies tetraplóides é um indício de origem alopoliplóide ou anfidiplóide e que a formação de bivalentes ocorre devido a um pareamento autosindético. Estudando algumas F1 híbridas, os autores relatam que as progênies resultantes do cruzamento entre espécies com igual nível de ploidia (*L. diversifolia* ssp. *trichandra* x *L. shannonii*, *L. diversifolia* ssp. *trichandra* x *L. lanceolata* e *L. diversifolia* ssp. *diversifolia* x *L. leucocephala*) apresentaram somente formação de bivalentes em diacinese e metáfase I. Já a F1 triploide resultante do cruzamento entre *L. lanceolata* (2x) e *L. leucocephala* (4x), apresentou problemas na meiose, com presença de univalentes e segregação anormal em anáfase I e telófase I.

Os resultados deste trabalho foram importantes pois permitiram aos autores, discutir as relações evolutivas do gênero. Pan & Brewbaker (1988), sugeriram que:

1º) de acordo com os dados de número cromossômico básico, a maioria das espécies é diplóide, com  $n=26$ ; as espécies com  $n=28$  podem ter derivado das espécies com  $n=26$  ou de um ancestral com  $n=14$ ; que as espécies poliplóides podem ter surgido por aloploidia (*L. leucocephala* e *L. pallida*) ou autopoliploidia (*L. diversifolia* ssp. *diversifolia*) e que haveriam dois números cromossômicos básicos  $x=13$  e  $x=14$ ;

2º) que os mecanismos de isolamento no gênero não incluem barreiras para hibridação interespecífica, sendo mais provável que os mecanismos de diferenciação das espécies incluam barreiras geográficas, ecológicas e, principalmente, poliploidia.

Freitas *et al.* (1988) analisaram o número cromossômico e o comportamento meiótico em algumas espécies e híbridos selecionados para tolerância a solos ácidos. As contagens cromossômicas foram realizadas para *L. leucocephala*, *L. diversifolia* (diplóide e tetraplóide), *L. pulverulenta* e para progênies F1, F2 e F3 híbridos de *L. leucocephala* x *L. diversifolia* (2x), e para F1 híbrida de *L. leucocephala* x *L. diversifolia* (4x), *L. leucocephala* x *L. esculenta* e *L. leucocephala* x *L. shannonii*.

Uma variação intraespecífica no número cromossômico foi detectada em *L. leucocephala*, *L. diversifolia* e seus híbridos provavelmente devido a hibridação natural, o que também poderia explicar o alto número cromossômico

( $2n=90$ ) encontrado para uma planta de *L. pulverulenta* normalmente com  $2n=56$ .

Segundo Freitas *et al.* (1988), a meiose foi considerada regular, com preferencial formação de bivalentes em metáfase I, para maioria das espécies e híbridos. Essa regularidade meiótica foi refletida nos altos índices meióticos (acima de 90%) e na alta fertilidade do pólen (de 96 a 100%). Quanto à fertilidade dos híbridos, as progênies derivadas de cruzamentos entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia* foram todas férteis, enquanto que os híbridos de *L. leucocephala* x *L. esculenta* e *L. leucocephala* x *L. shannonii*, apresentaram-se parcialmente estéreis. Os autores comentam que esta esterilidade pode envolver problemas de germinação do grão de pólen ou incompatibilidade embrião-endosperma. Cabe salientar que medida da fertilidade das plantas foi baseada através da estimativa do índice meiótico e da fertilidade dos grãos de pólen.

A regularidade meiótica dos híbridos de *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, segundo Freitas *et al.* (1988), pode ser explicada de duas formas:

1ª) pelo fato das duas espécies possuírem cromossomos similares e homólogos, permitindo que ocorra pareamento entre homeólogos intra e interespecífico. Neste caso, sugere-se que exista um forte mecanismo de controle genético do pareamento (só II), pois conforme seria esperado, não ocorreram associações múltiplas;

2ª) os cromossomos das duas espécies são incompatíveis e não pareiam, ocorrendo somente pareamento intraespecífico, neste caso, não ocorreria sobre cruzamento entre os cromossomos das duas espécies e os genes de

cada espécie presentes em um cromossomo em particular poderiam ser transmitidos aos seus híbridos como um bloco único. Este fato tem importantes implicações teóricas e práticas para o melhoramento de plantas, já que algumas características que vão ser melhoradas irão ser transmitidas junto com outras.

Freitas *et al.* (1991) estudando o número cromossômico e a meiose de híbridos entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, ambas tetraplóides e com  $2n=4x=104$  cromossomos, encontrou para a maioria dos indivíduos híbridos  $2n=104$ , uma variação de 86 a 103 cromossomos. A meiose foi considerada regular, com preferencial formação de bivalentes nas 183 plantas analisadas. Esta preferencial formação de bivalentes sugere que exista um forte controle do pareamento nas espécies, pois, considerando a facilidade de cruzamento, as duas espécies devem possuir homeologia e seria de esperar a formação de associações múltiplas. No entanto, este não foi o caso.

Palomino *et al.* (1995) realizaram estudos citogenéticos com espécies de *Leucaena* presentes no México e relataram que dos sete taxa estudados quatro eram diplóides com  $2n=56$  cromossomos (*L. diversifolia*, *L. trichandra*, *L. lanceolata* ssp. *lanceolata* e *L. lanceolata* ssp. *sousae*). Dois taxa eram tetraplóides com  $2n=112$  (*L. confertiflora* ssp. *adenotheloidea* e *L. esculenta* ssp. *paniculata*). *L. esculenta* ssp. *esculenta* apresentou os dois níveis de ploidia, um acesso com  $2n=52$  e outro acesso com  $2n=112$ .

Os resultados deste trabalho são um pouco controversos por apresentarem números cromossômicos diferentes para espécies anteriormente

analisadas, como por exemplo para *L. lanceolata*, e não terem sido confirmados em trabalhos detalhados posteriores.

Os trabalhos citados referentes a citogenética de *Leucaena* não conseguiram preencher as lacunas existentes quanto ao número cromossômico no gênero pois as contagens referiam-se normalmente a poucas plantas por espécie e os estudos meióticos foram realizados somente em algumas espécies e populações híbridas. Recentemente, o número cromossômico foi determinado para todas as espécies (Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b).

Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) conduziram o primeiro estudo citogenético para maioria das espécies de *Leucaena* e para populações destas espécies. As contagens cromossômicas foram realizadas para 51 acessos, fornecendo um novo panorama citogenético para o gênero descrito abaixo:

a)  $2n=2x=52 \Rightarrow L. collinsii$  ssp. *collinsii*, *L. esculenta*, *L. lanceolata* var. *lanceolata* e var. *sousae*, *L. magnifica*, *L. pueblana*, *L. shannonii* e *L. trichandra*;

b)  $2n=2x=56 \Rightarrow L. collinsii$  ssp. *zacapana*, *L. greggii*, *L. macrophylla* ssp. *istmensis* e *L. matudae*;

c)  $2n=4x=104 \Rightarrow L. confertiflora$  var. *confertiflora* e var. *adenotheloidea*, *L. diversifolia*, *L. leucocephala* ssp. *leucocephala* e ssp. *glabrata*, *L. pallida* e *L. x spontanea*;

d)  $2n=4x=112 \Rightarrow L. confertiflora$  var. *adenotheloidea*, *L. involucrata* e *L. pallida*.

Os resultados obtidos por Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) apresentam várias contribuições para a taxonomia e evolução do grupo.



Primeiramente, foi confirmada a existência de mais uma espécie tetraplóide no gênero (*L. involucrata*). A variabilidade interespecífica e intrapopulacional, quanto ao número cromossômico, encontrada em algumas espécies de *Leucaena* (*L. pallida*, *L. collinsii*, *L. confertiflora*, *L. macrophylla* e *L. trichandra*), confirmam a complexidade da evolução e especiação no gênero, e também apóiam a possibilidade de origens múltiplas de alguns taxa.

Cardoso *et al.* (2000) estudaram o número cromossômico de 52 indivíduos de 14 taxa de *Leucaena* e publicaram pela primeira vez o número cromossômico para *L. lempirana* ( $2n=52$  e  $56$ ) e *L. cuspidata* ( $2n=52$ ). Neste mesmo trabalho, foi encontrada uma variabilidade intraespecífica para *L. lempirana*, *L. macrophylla* e *L. shannonii*, e também foi identificada uma população diplóide de *L. pallida*.

Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) e Cardoso *et al.* (2000), completaram os estudos de contagem cromossômica para a maior parte das espécies (Tabela 2). Analisados conjuntamente estes dados permitem realizar inferências sobre a variabilidade intra e interespecífica e suas conseqüências para taxonomia. Para *L. collinsii* ssp. *collinsii* (uma população) e para ssp. *zacapana* (duas populações), foram encontrados dois números cromossômicos,  $2n=52$  e  $2n=56$ , respectivamente. Variação semelhante foi encontrada para *L. macrophylla* ssp. *istmensis* com  $2n=52$  e ssp. *macrophylla*  $2n=56$ . Estas diferenças no número cromossômico podem refletir uma relação com a delimitação de subespécies. As populações destas espécies foram coletadas na forma de "bulk" (vários indivíduos), logo pode-se presumir de

Tabela 2 – Números cromossômicos de *Leucaena* determinados por Schifino-Wittmann *et al.*(2000b) e Cardoso *et al.*(2000).

Espécies	Schifino-Wittmann <i>et al.</i> (2000b)	Cardoso <i>et al.</i> (2000)
<i>L. collinsii</i> subsp. <i>collinsii</i>	52	
<i>L. collinsii</i> subsp. <i>zacapana</i>	56	
<i>L. confertiflora</i> var. <i>confertiflora</i>	104	
<i>L. confertiflora</i> var. <i>adenotheoidea</i>	104 e 112	
<i>L. cuspidate</i>		52
<i>L. diversifolia</i>	104	
<i>L. esculenta</i>	52	
<i>L. greggii</i>	56	
<i>L. involucrate</i>	112	112
<i>L. lanceolata</i> var. <i>lanceolata</i>	52	52
<i>L. lanceolata</i> var. <i>sousae</i>	52	
<i>L. lempirana</i>		52 e 56
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>leucocephala</i>	104	
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	104	
<i>L. macrophylla</i> ssp. <i>istmensis</i>	52 e 56	52
<i>L. macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i>		56
<i>L. magnífica</i>	52	
<i>L. matudae</i>	56	
<i>L. pallida</i>	104 e 112	56
<i>L. pueblana</i>		52 e 56
<i>L. pulverulenta</i>	56	
<i>L. retusa</i>		52
<i>L. salvadorensis</i>		56
<i>L. shannonii</i>	52	52 e 56
<i>L. trichandra</i>	52 e 104	
<i>L. trichodes</i>		56
<i>L. x spontanea</i>	104	
<i>L. ? hybrid</i>	>100	112

acordo com Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) e Cardoso *et al.* (2000), que estas variações refletem diferenças taxonômicas. Ainda, a existência de números cromossômicos básicos diferentes em um taxon e principalmente a existência de números cromossômicos básicos diferentes em vários taxa, por exemplo *L. collinsii* ( $2n=52$  e  $56$ ) e *L. confertiflora* ( $2n=104$  e  $112$ ), apóiam um complexo padrão de evolução no gênero.

Hartman *et al.* (2000) realizaram um primeiro trabalho preliminar com citogenética molecular em *Leucaena* utilizando a técnica de FISH (Flourescence *in situ* Hibridization) juntamente com dados citogenéticos clássicos e estimativa de tamanho do genoma. Os autores encontraram, em *L. leucocephala*, um par de cromossomos sub-metacêntricos morfologicamente distintos de todos os outros cromossomos e verificaram que este mesmo par ocorre em *L. lanceolata* – um possível progenitor paterno de *L. leucocephala*. Quanto ao tamanho do genoma foi verificado um tamanho modal de 1.5-2.0 pg e também, que o valor  $2C$  de *L. leucocephala* é a soma dos valores de *L. lanceolata* e *L. pulverulenta* (o possível progenitor materno). O alto valor  $2C$  (2.29 pg) confirmou a natureza poliplóide de *L. involucrata*.

Para *L. leucocephala*, a espécie alvo deste estudo com FISH, Hartman *et al.* (2000) encontraram a presença de seis maiores sítios e dois menores sítios de genes ribossomais 5.8, 18 e 25s e sugerem que estas informações possam ser utilizadas para verificar os possíveis progenitores de *L. leucocephala* e de outras espécies de *Leucaena* e para detectar qualquer mudança no cariótipo em futuros trabalhos.

Além disso, os autores sugerem que sejam realizados futuros trabalhos com a técnica de Genomic *in situ* Hybridization (GISH), onde o conjunto de cromossomos dos possíveis progenitores sejam marcados e usados como sondas, procurando esclarecer as relações de parentesco entre as espécies e fornecer novos "insights" sobre a evolução do gênero.

#### **2.2.4.2 – Espécies tetraplóides: possíveis origens**

O número cromossômico fornece um tipo de dado especial (nível de ploidia) quando as espécies dentro do gênero possuem conjuntos múltiplos de cromossomos - poliplóides (Hughes, 1998a). Como já citado, *Leucaena* é um gênero que possui atualmente cinco espécies tetraplóides: *L. confertiflora*, *L. diversifolia*, *L. leucocephala*, *L. pallida* e *L. involucrata* (Gonzales *et al.*, 1967; Pan & Brewbaker, 1988; Freitas *et al.*, 1991; Palomino *et al.*, 1995, Hughes 1998b; Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b).

Sabe-se que a maioria das plantas superiores são poliplóides (Stebbins, 1971), com estimativa de 95% das pteridófitas e 80% das angiospermas (Leitch & Bennett, 1997). Stebbins (1971) apontou que a poliploidia foi o evento citogenético mais importante na evolução das plantas superiores. Segundo Leitch & Bennett (1997), a poliploidia teve um papel importante na evolução das plantas superiores, sendo a alopoliploidia mais comum que a autopoliploidia em plantas, e muitas das espécies economicamente importantes são poliplóides, como o trigo, o algodão, o café, a alfafa entre outras.

Dados recentes sugerem que a formação de poliplóides é um evento comum e recorrente na natureza, sendo que as espécies poliplóides teriam surgido várias vezes durante a evolução, e a maioria dos poliplóides teriam múltiplas origens (Soltis *et al.*, 1995; Leicht & Bennet, 1997; Segraves *et al.* 1999; Soltis & Soltis, 1999).

Na natureza, os poliplóides podem conter várias cópias de um único genoma ou de dois ou mais genomas distintos, sendo chamados de autopoliplóides e alopoliplóides, respectivamente. A formação das espécies poliplóides se dá, preferencialmente, através da fusão de gametas citologicamente não reduzidos (Harlan & De Wet, 1975; Ramsey & Schemske, 1998; Schifino-Wittmann & Dall'Agnol, 2001).

No caso de *Leucaena*, a origem das espécies poliplóides permanece sem solução, mas para três das cinco espécies conhecidas, as evidências de cpDNA sugerem que elas tenham se originado por alopoliploidia (Hughes, 1998a), após a hibridação entre duas espécies diplóides.

Para solucionar a questão sobre a origem das espécies poliplóides do gênero, pesquisadores tem utilizado técnicas mais avançadas como a análise molecular de DNA de cloroplasto (cpDNA), cuja herança, no gênero, é materna. Neste caso, as espécies tetraplóides aparecem como espécies irmãs de seus progenitores maternos (Harris *et al.*, 1994a).

As supostas origens dos tetraplóides de *Leucaena* estão baseadas principalmente em dados provenientes de análises moleculares (Harris *et al.*, 1994a). O progenitor materno de *L. leucocephala* é provavelmente *L. pulverulenta* ou uma espécie com cpDNA do tipo dela, segundo Harris *et al.*

(1994a). O progenitor masculino permanece desconhecido, mas dados morfológicos sugerem que *L. leucocephala* seja um híbrido entre uma espécie com folíolos grandes e uma espécie com folíolos pequenos (*L. pulverulenta*). Hughes (1998a), sugeriu que pela distribuição de *L. pulverulenta* no México os prováveis progenitores masculinos sejam *L. lanceolata* ou *L. macrophylla*, pois são as únicas espécies que ocorrem na mesma área e possuem folíolos grandes. Devido à baixa cruzabilidade de *L. macrophylla*, é muito provável que o progenitor masculino seja *L. lanceolata*.

No caso de *L. diversifolia*, foi sugerida origem autotetraplóide derivada de *L. trichandra* (Pan & Brewbaker, 1988). No entanto, as análises de cpDNA indicam que estas duas espécies possuem genomas de cloroplasto muito distintos para ser sugerida origem autotetraplóide. Foi então proposta uma origem alotetraplóide, sendo sugerido como progenitor feminino *L. pulverulenta* (Harris *et al.* 1994a) e como progenitor masculino *L. trichandra* (definido por análises morfológicas).

Pan & Brewbaker (1988) sugeriram para *L. pallida* origem alotetraplóide proveniente da hibridação entre *L. esculenta* e *L. trichandra*. No entanto dados recentes sugerem que *L. pueblana* seja o progenitor materno (Hughes, 1998b; Harris *et al.*, 1994a).

A origem dos tetraplóides *L. confertiflora* e *L. involuocrata* permanece desconhecida (Hughes, 1998b).

Um indivíduo tetraplóide ( $2n=104$ ) foi encontrado em duas populações de *L. trichandra* (Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*,

2000b), o que poderia ser resultado de uma poliploidização espontânea, sugerindo que a autopoliploidia possa ser um processo comum em *Leucaena*.

Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) e Cardoso *et al.* (2000) sugeriram múltiplas origens para *L. confertiflora* ( $2n=4x=104$  e  $112$ ) e *L. pallida* ( $2n=4x=104$  e  $112$ ) com base nos dados citogenéticos de número cromossômico. Isto está de acordo com a tendência atual de aceitar-se que a poliploidia em plantas é um fenômeno múltiplo e recorrente (Soltis e Soltis, 1999).

### 2.2.5 – Modos de reprodução e hibridação

A maioria das espécies de *Leucaena* possui modo de reprodução já determinado, o que não acontece para espécies pouco estudadas como *L. confertiflora*, *L. cuspidata*, *L. lempirana* e *L. pueblana* (Hughes 1998a).

Fazendo um breve resumo dos modos de reprodução das espécies de *Leucaena* tem-se:

→ **espécies de fecundação cruzada predominante:** *L. collinsii*, *L. diversifolia*, *L. esculenta*, *L. greggii*, *L. lanceolata*, *L. macrophylla*, *L. matudae*, *L. multicapitulata*, *L. pallida*, *L. pulverulenta*, *L. retusa*, *L. salvadorensis*, *L. shannonii*, *L. trichandra* e *L. trichodes*, algumas delas autoférteis.

→ **espécie de autofecundação:** *L. leucocephala*.

Diversos trabalhos revelam a existência de híbridos espontâneos entre espécies de *Leucaena* (Gonzales *et al.*, 1967, Brewbaker, 1988; entre outros), entretanto, o registro mais comum no mundo todo tem sido de híbridos espontâneos entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia*, conhecido como *L. x*

*spontanea* e de híbridos entre *L. leucocephala* e *L. esculenta*, conhecido como *L. x mixtec* (Hughes, 1998a).

Sorensson e Brewbaker (1994) realizando estudos de cruzabilidade relatam que existem poucas barreiras genéticas para hibridação em *Leucaena*, sendo que as barreiras existentes são tipicamente geográficas, remetendo a uma especiação alopátrica. Segundo Sorensson (1995), a alta intercompatibilidade entre as espécies tetraplóides permite que estas espécies sejam consideradas como um “pool gênico primário” nos programas de melhoramento via hibridação artificial. Hughes (1998a) comentou que este é um mecanismo significativo na história evolutiva de *Leucaena*, principalmente pela presença de dois níveis de ploidia, pela elevada cruzabilidade das espécies e pela ocorrência de híbridos naturais.

A origem híbrida foi proposta para três das cinco espécies tetraplóides conhecidas - *L. diversifolia*, *L. pallida* e *L. leucocephala* (Harris *et al.*, 1994a; Hughes, 1998a), ratificando a importância da hibridação como um mecanismo atuante no processo de especiação no gênero.

Um outro fator que favorece fortemente a hibridação é a interferência humana no processo de domesticação das espécies. O transporte das espécies para regiões fora do seu habitat nativo, tem permitido a quebra das barreiras reprodutivas (geográficas) facilitando o contato entre espécies diferentes e o surgimento de híbridos naturais (Hughes e Harris, 1994).

Programas de melhoramento de *Leucaena* têm focalizado este potencial de formação de híbridos espontâneos pela facilidade que oferecem para transferência de genes entre as espécies e para o desenvolvimento de



híbridos com características de interesse. No entanto, híbridos espontâneos, assim como qualquer outra planta introduzida fora de seu habitat nativo, representam um risco à vegetação nativa, podendo-se transformar em espécies invasoras ou contaminar os recursos genéticos (Hughes, 1988a).

Maiores detalhes sobre o processo de hibridação e sobre os híbridos existentes podem ser obtidos em Hughes (1998a).

#### **2.2.6 – Estudos com *Leucaena* no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS**

Desde 1984, o Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia da UFRGS (DPFA-UFRGS), realiza estudos citogenéticos, agronômicos e fenológicos de espécies e híbridos de *Leucaena*. Os primeiros estudos foram conduzidos por Freitas *et al.* (1988), que analisaram citogeneticamente material proveniente de cruzamentos entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia* (diplóide e tetraplóide), realizados no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em Cali, na Colômbia, através da colaboração com o Dr. E. Mark Hutton.

Das sementes provenientes deste cruzamento, foi estabelecida, em 1987, uma população de híbridos entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia* tetraplóide na Estação Experimental Agronômica da UFRGS (EEA-UFRGS). A partir do estabelecimento desta população e de suas progênes em 1993, diversos estudos foram conduzidos (Freitas, *et al.*, 1991; 1995; 1999; Simioni, 1996; Simioni *et al.*, 1998; 1999; Sarmiento, 1999; Schifino-Wittmann, 1997; 2000; Schifino-Wittmann & Simioni, 1998; Schifino-Wittmann *et al.* 1997; 1999),

investigando características citogenéticas, florais, morfológicas, padrões de isoenzimas, rendimento de matéria seca, qualidade de forragem, taxa de rebrote e tolerância ao frio, que permitiram a seleção de alguns materiais. Este conjunto de dados, além de reunir informações básicas importantes, demonstrou o bom potencial de híbridos de *Leucaena* como espécies forrageiras no Rio Grande do Sul (Schifino-Wittmann, 2000).

Em 1996, uma coleção de 78 acessos de 22 taxa de *Leucaena* foi estabelecida da EEA-UFRGS, com o objetivo de caracterizar o desenvolvimento das espécies nas condições ambientais do Rio Grande do Sul (Kaminski, 1998). As sementes utilizadas foram enviadas pelo Oxford Forestry Institute (OFI), Reino Unido, que iniciou sua coleção de sementes em meados de 1980, já que muitas espécies novas haviam sido descobertas na Guatemala e Honduras e muitas dessas estavam ameaçadas de descaracterização ou extinção (Hughes & Harris, 1995).

Através de um intercâmbio informal com o grupo de pesquisadores do OFI, que realizam coletas e desenvolvem estudos em taxonomia e biologia molecular, e coordenam experimentos a campo em nível mundial, o grupo de melhoramento do DPFA recebeu material para análise citogenética e para observação sobre o comportamento deste germoplasma nas condições do Rio Grande do Sul.

Kaminski (1998) e Kaminski *et al.* (2000), verificaram a grande variabilidade intraespecífica e interespecífica na duração e no início do período vegetativo, de florescimento, de frutificação e maturação das vagens entre os acessos e espécies de *Leucaena* da coleção do OFI, que foi plantada na EEA-

UFRGS e que continua sendo mantida. Estes estudos identificaram alguns materiais com potencial forrageiro, quanto à taxa de crescimento.

Atualmente, as pesquisas com *Leucaena* no DPFA continuam somente na área da citogenética, com estudos sobre o comportamento meiótico e análise da fertilidade dos grãos de pólen, já que as determinações de número cromossômico foram completadas para todas as espécies (Schifino-Wittmann *et al.* 2000b; Cardoso *et al.* 2000).

No entanto, muitos outros trabalhos poderiam ser realizados futuramente com esta coleção mantida na EEA-UFRGS, como por exemplo, investigações na área de polinização, de produção de sementes, de nutrição animal e outros trabalhos avaliando o germoplasma após seis anos de estabelecimento nas condições do Estado.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material utilizado**

Em 1996, uma coleção de 78 acessos de 22 espécies de *Leucaena* provenientes do Oxford Forestry Institute (OFI), foi estabelecida na Estação Experimental da Agronomia (EEA) – UFRGS, num delineamento de 3 blocos casualizados (Tabela 3, Figura 3). Para maiores detalhes sobre o material consultar Kaminski (1998).

A EEA-UFRGS situa-se na região fisiográfica da Depressão Central aos 30° 05'22" de latitude S e 51°39'08" de longitude W, com clima subtropical úmido (Cfa). Os nomes científicos seguem a classificação de Hughes (1998a).

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 – Coleta, fixação e estocagem do material**

Para análise da meiose e da fertilidade do pólen, as inflorescências jovens em vários estádios de desenvolvimento foram coletadas, durante 1998, 1999, 2000 e 2001 (Figura 4). Como a coleção está constituída de diferentes espécies de *Leucaena* com diferentes épocas de florescimento, a coleta do

TABELA 3 – Relação do material utilizado para análise neste experimento.

Classificação	Número de Identificação (OFI)
<i>L. collinsii</i> ssp. <i>zacapana</i>	56/88
<i>L. collinsii</i> ssp. <i>zacapana</i>	57/88
<i>L. collinsii</i> ssp. <i>collinsii</i>	45/85
<i>L. collinsii</i> ssp. <i>collinsii</i>	51/88
<i>L. confertiflora</i> var. <i>adenotheleidea</i>	119/92
<i>L. confertiflora</i> var. <i>adenotheleidea</i>	87/94
<i>L. cuspidata</i>	83/94
<i>L. diversifolia</i>	45/87
<i>L. diversifolia</i>	46/87
<i>L. diversifolia</i>	01/90
<i>L. diversifolia</i>	82/92
<i>L. diversifolia</i>	83/92
<i>L. diversifolia</i>	126/92
<i>L. diversifolia</i>	104/94
<i>L. diversifolia</i>	105/94
<i>L. diversifolia</i>	106/94
<i>L. diversifolia</i>	107/94
<i>L. esculenta</i>	47/87
<i>L. esculenta</i>	48/87
<i>L. greggii</i>	82/87
<i>L. ? híbrido</i>	52/87
<i>L. involucrata</i>	87/92
<i>L. lanceolata</i> var. <i>lanceolata</i>	43/85
<i>L. lanceolata</i> var. <i>lanceolata</i>	44/85
<i>L. lanceolata</i> var. <i>lanceolata</i>	90/92
<i>L. lanceolata</i> var. <i>lanceolata</i>	134/92
<i>L. lanceolata</i> var. <i>sousae</i>	50/87
<i>L. lanceolata</i> var. <i>sousae</i>	51/87
<i>L. lempirana</i>	05/91
<i>L. lempirana</i>	06/91
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	19/81
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	32/88
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	44/88
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	45/88
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	145/91
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	34/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	92/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	95/92

TABELA 3 – Continuação.

Classificação	Número de Identificação (OFI)
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	121/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	136/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	139/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	30/93
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>glabrata</i>	102/94
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>leucocephala</i>	133/92
<i>L. leucocephala</i> ssp. <i>leucocephala</i>	147/92
<i>L. macrophylla</i> ssp. <i>macrophylla</i>	55/88
<i>L. macrophylla</i> ssp. <i>istmensis</i>	47/85
<i>L. macrophylla</i> ssp. <i>istmensis</i>	39/89
<i>L. magnifica</i>	19/84
<i>L. magnifica</i>	58/88
<i>L. matudae</i>	49/87
<i>L. multicapitulata</i>	81/87
<i>L. multicapitulata</i>	86/87
<i>L. pallida</i>	78/92
<i>L. pallida</i>	79/92
<i>L. pulverulenta</i>	22/86
<i>L. pulverulenta</i>	83/87
<i>L. pulverulenta</i>	84/87
<i>L. retusa</i>	23/86
<i>L. salvadorensis</i>	17/86
<i>L. salvadorensis</i>	34/88
<i>L. salvadorensis</i>	07/91
<i>L. shannonii</i>	26/84
<i>L. shannonii</i>	141/92
<i>L. shannonii</i>	135/92
<i>L. shannonii</i>	53/87
<i>L. trichandra</i>	35/88
<i>L. trichandra</i>	53/88
<i>L. trichandra</i>	03/91
<i>L. trichandra</i>	04/91
<i>L. trichandra</i>	126/92
<i>L. trichandra</i>	128/92
<i>L. trichandra</i>	131/92
<i>L. trichandra</i>	137/92
<i>L. trichandra</i>	140/92
<i>L. trichodes</i>	02/86
<i>L. trichodes</i>	61/88
<i>L. xspontanea</i>	98/94



FIGURA 3– População de *Leucaena* na EEA-UFRGS.

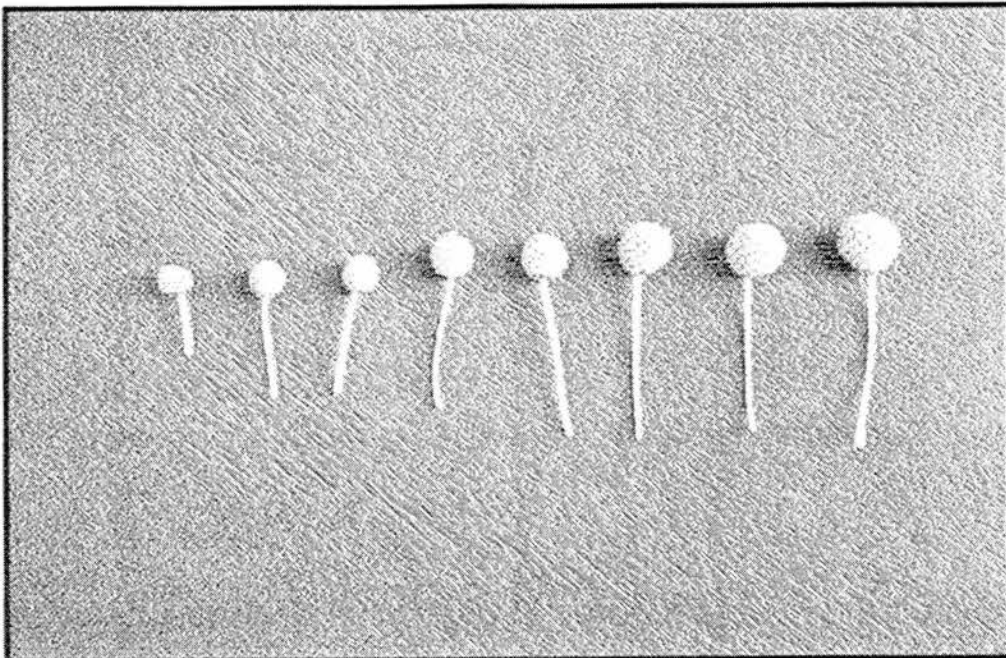


FIGURA 4 – Inflorescências de *Leucaena* – fases de desenvolvimento.

material foi realizada nas diferentes estações do ano, sendo raro coletar no inverno. As coletas foram realizadas, preferencialmente, pela manhã e as inflorescências foram coletadas e analisadas de cada planta individualmente, procurando-se coletar o maior número possível de plantas por acesso. Após, as inflorescências foram fixadas, ainda no campo, em solução 6:3:1 (etanol:clorofórmio:ácido acético) e deixadas por 24 horas em temperatura ambiente. O material foi então transferido para álcool 70% e armazenado em congelador até a preparação das lâminas (Figura 5).

### **3.2.2 – Preparo das lâminas**

As lâminas foram preparadas com flores retiradas das inflorescências coletadas. De cada flor eram separadas somente as anteras sobre as quais era colocado, através de um conta-gotas, o corante carmim propiônico (Figura 6). A partir deste momento, as anteras eram esmagadas na lâmina, cobertas com lamínula, pressionadas, e em seguida batidas com a extremidade basal de uma agulha histológica para obter um bom espalhamento das células e dos cromossomos. Cabe salientar que para a boa observação de grãos-de-pólen e de tetrades não realizava-se a pressão para evitar o rompimento das tétrades e da parede do grão-de-pólen. Após terminada a confecção da lâmina, esta era selada com luto – uma mistura de breu e cera de abelha na proporção 1:1, identificada e guardada para posterior observação ao microscópio. Lâminas para análise de



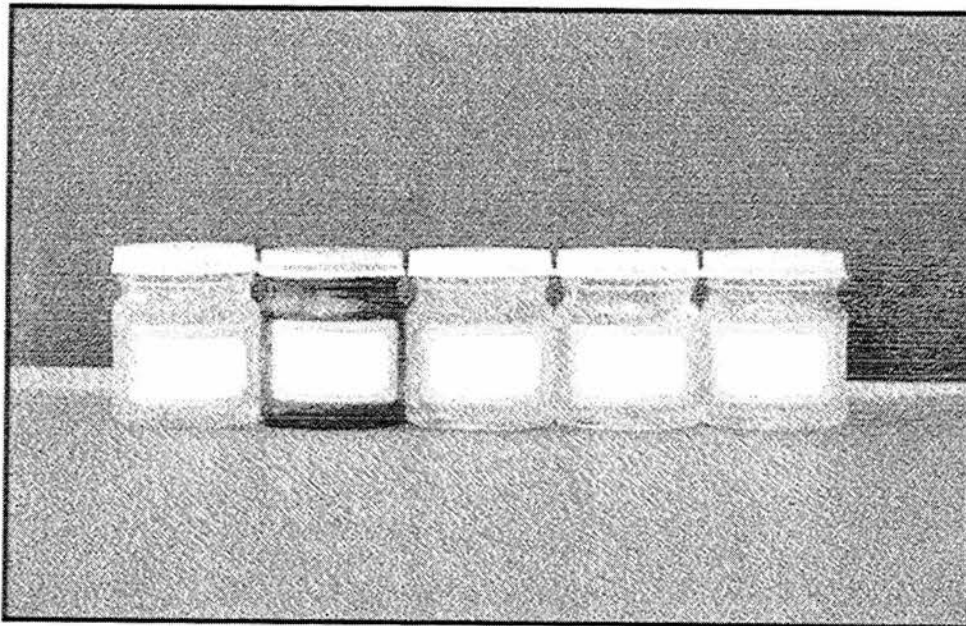


FIGURA 5 – Inflorescências fixadas e estocadas em álcool 70%.

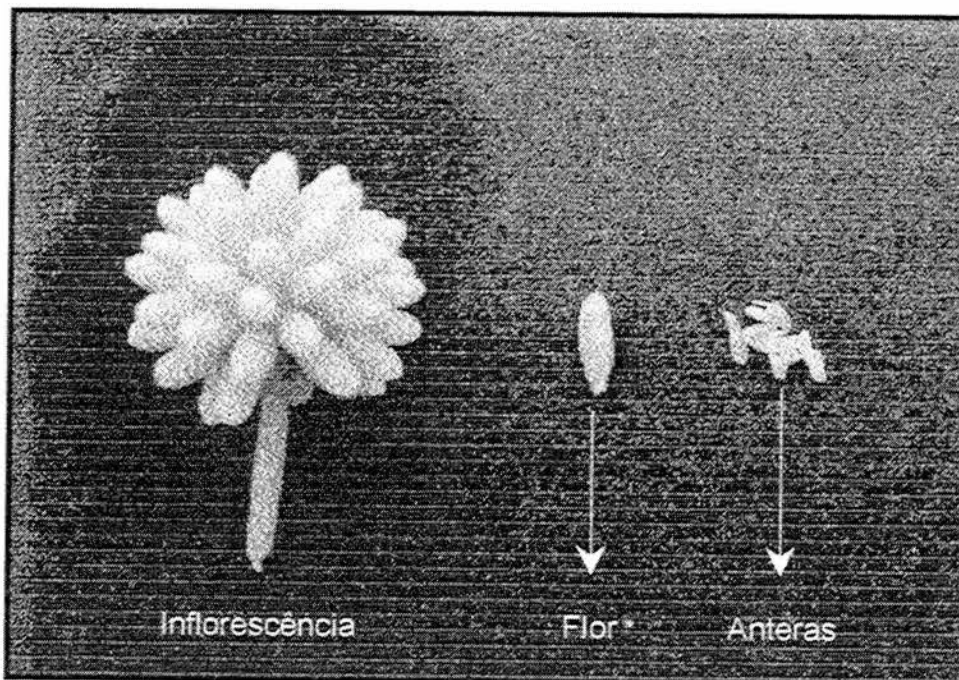


FIGURA 6 – Separação das estruturas desejadas para preparação da lâmina.

meiose eram analisadas em, no máximo, dois dias após o preparo, enquanto que as lâminas de grão-de-pólen eram analisadas no mesmo dia ou no dia seguinte. As lâminas até análise e após esta, ficaram guardadas na geladeira em caixas especiais.

### **3.2.3 – Análise do comportamento meiótico**

Estudos do comportamento meiótico foram realizados em células mãe de pólen em diferentes fases para caracterização citogenética da população. Para cada indivíduo foi analisado o maior número de células possíveis, em todas as fases da meiose. Especial atenção foi dada a diacinese e metáfase I para observação das associações cromossômicas. A ocorrência de univalentes (I), bivalentes (II), trivalentes (III), quadrivalentes (IV) e multivalentes era registrada. Quando as células apresentavam todos os seus cromossomos em associações bivalentes eram consideradas como normais ou de comportamento regular. Em anáfase e telófase I, observou-se a disjunção dos cromossomos e sua migração para pólos, registrando-se também células que apresentavam cromossomos retardatários, pontes e disjunção irregular. Em anáfase e telófase II, também se observou a disjunção dos cromossomos e possíveis irregularidades. As análises foram realizadas diretamente em microscópios ópticos ou em microscópio óptico acoplado com câmera digital e com auxílio de um programa de captação de imagens (Sistema Digital de Imagens - SDI), que permitia um aumento

considerável da célula. A documentação das fases foi realizada através de desenhos, fotomicrografias e imagens digitais.

#### **3.2.4 – Estudo das tétrades**

Como complementação à análise de meiose, Love (1949) sugeriu a utilização de índice meiótico, que representa a percentagem de quartetos de pólen normais, como indicador de regularidade meiótica. O índice meiótico foi calculado, conforme descrito por Love (1949), dividindo-se o número de tétrades normais pelo número total de tétrades observadas vezes 100. As tétrades foram consideradas normais quando apresentavam quatro micrósporos de tamanho igual e anormais aquelas com número de células diferentes de quatro e/ou com tamanhos desiguais. Para cada indivíduo foram analisadas duas lâminas, sendo contadas aleatoriamente por lâmina, 200 tétrades, totalizando 400 tétrades por indivíduo.

#### **3.2.5 – Estudo de grãos de pólen**

A viabilidade do pólen foi estimada de acordo com a capacidade de coloração dos grãos com carmim propiônico. Foram considerados viáveis os grãos que se apresentaram corados, de tamanho normal, com 3 poros e com intina e exina bem diferenciadas.

Para cada indivíduo foram analisadas três lâminas, sendo contados por lâmina 200 grãos aleatoriamente, totalizando 600 grãos por indivíduo. Durante a

análise eram registrados grãos de pólen corados (viáveis), parcialmente corados (parcialmente viáveis), vazios (inviáveis), macro e micropólen corados e vazios. O percentual de grãos de pólen viáveis foi estimado, dividindo-se o número de grãos corados pelo total de grãos observados vezes 100.

### **3.2.6 – Análise dos dados**

Como para pesquisas em citogenética, a análise dos dados é mais descritiva do que estatística, a comparação da viabilidade dos grãos de pólen e do índice meiótico foram realizados cálculos de média e amplitude de variação. A análise do comportamento meiótico foi realizada com auxílio de tabelas, comparando-se as configurações e disjunções observadas entre diferentes plantas e acessos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Comportamento meiótico

A investigação do comportamento meiótico nas espécies de *Leucaena* foi dificultada pelo pequeno tamanho dos cromossomos, que, também, freqüentemente encontravam-se sobrepostos, e em muitos casos, pela grande quantidade de gordura no citoplasma, que prejudicava a visualização dos cromossomos. Um outro problema foi determinar o tamanho ideal das inflorescências, flores e anteras em que se encontravam as fases meióticas, pois as plantas analisadas apresentavam uma grande variação entre indivíduos dentro do mesmo acesso e espécie, o que prejudicava o fluxo contínuo do trabalho.

Todas as análises do pareamento cromossômico foram realizadas em diacinese e metáfase I pela maior facilidade de visualização dos cromossomos e das associações que estes apresentavam. Em anáfase I e II, foi observada a disjunção e registradas, quando ocorria, a presença de pontes ou cromossomos retardatários, facilmente identificados. Quanto à segregação dos cromossomos nesta fase, a contagem foi prejudicada pelo tamanho e pela freqüente sobreposição dos cromossomos. As outras fases da meiose foram somente registradas para melhor documentar toda a divisão meiótica.

Cabe salientar, que em muitas células em diacinese e/ou metáfase I a presença de associações múltiplas era evidente, no entanto, tornava-se difícil identificar quantos cromossomos estavam associados e qual era a configuração apresentada, pelas razões já citadas.

A Tabela 4 apresenta os resultados da análise meiótica para 13 espécies e 43 acessos. Nesta tabela, os resultados dos indivíduos foram agrupados por acesso. Para as espécies *L. macrophylla*, *L. retusa*, *L. salvadorensis*, *L. confertiflora*, *L. involucrata* e *L. ? hybrid* foram analisados somente um acesso. No Apêndice 1 encontram-se as análises detalhadas realizadas para cada indivíduo. Num primeiro momento, o comportamento meiótico das espécies de *Leucaena* será apresentado e discutido separadamente para as espécies diplóides e tetraplóides.

#### **4.1.1. Comportamento meiótico das espécies diplóides**

As espécies diplóides analisadas foram *L. macrophylla*, *L. pulverulenta*, *L. retusa*, *L. salvadorensis*, *L. shannonii* e *L. trichandra*, como apresentado na Tabela 4. A maioria das espécies apresentaram comportamento meiótico regular, com predominante formação de bivalentes. Entretanto, outros tipos de associações foram observadas em frequências variáveis.

*L. macrophylla*, acesso 55/88, apresentou várias anormalidades, incluindo I, III, IV, multivalentes em 97,6% das células, bem como presença de aderências entre os cromossomos. As Figuras 7 e 8 apresentam células com

TABELA 4: Comportamento meiótico em acessos e espécies de *Leucaena*.

Espécie	Acesso <sup>1</sup>	2n	Nº de Indivíduos	Meiose			Número Total de Células
				Diacinese e Metáfase I <sup>2</sup>	Anáfase I <sup>3</sup>	Outras	
<i>L. confertiflora</i>	119/92	112	1	56II(18), A(5)	—	12	35
<i>L. diversifolia</i>	45/87	104	1	52II(25), 1-3IV(4), 2I(1), A(4), M(1)	N(2)	31	68
	46/87	104	2	52II (22)	N(3)	27	52
	01/90	104	2	52II(52), 2I(2), 2I+1IV(3), 1IV(2), A(2)	N(3)	10	74
	82/92	104	2	52II(51), 1-2IV(2)	—	16	69
	83/92	104	2	52II(71)	N(1)	13	85
	126/92	104	1	52II(9), 2I(1), 1IV(1)	D(1)	14	26
	104/94	104	2	52II(9)	N(2)	01	12
	105/94	104	3	52II(32), 2I(1), 1IV(1), M(3)	N(1)	22	60
	106/94	104	3	52II(50)	N(2)	11	63
	<i>L. involucrata</i>	87/92	112	1	56II(9), A(11)	—	02

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências, número de células entre parênteses.

<sup>3</sup> N, disjunção normal; D, disjunção irregular; R, presença de retardatários; P, pontes, número de células entre parênteses.

TABELA 4: Continuação

Espécie	Acesso <sup>1</sup>	2n	Nº de Indivíduos	Meiose			Número Total de Células
				Associações Diacinese e Metáfase I <sup>2</sup>	Anáfase I <sup>3</sup>	Outras	
<i>L. leucocephala glabrata</i>	19/81	104	2	52II(11), 1-2IV(19), 1III(3), 2I(1)	—	—	34
	32/88	104	5	52II(23), 1-2IV(9), 1IV+2I(3), 1M(1)	N(23)	21	80
	44/88	104	1	52II(7)	N(5)	26	38
	45/88	104	5	52II(36), 1IV(2)	N(2)	16	56
	145/91	104	3	52II(25), 1IV(2)	N(2)	—	29
	34/92	104	1	52II(5)	N(1)	28	34
	92/92	104	2	52II(67), 2-7I(6), 1IV(1)	N(2)	06	82
	95/92	104	1	52II(22)	—	08	30
	121/92	104	1	52II(11)	R(1)	10	22
	136/92	104	1	52II(13)	N(2)	01	16
30/93	104	2	52II(20), M(2)	N(4)	05	31	
<i>L. leucocephala leucocephala</i>	133/92	104	1	52II(17), 2I(2), 1IV(3), 2I+1IV(1), 1M(1), >52II (14)	—	37	75

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências, número de células entre parênteses.

<sup>3</sup> N, disjunção normal; D, disjunção irregular; P, presença de retardatários; P, pontes, número de células entre parênteses.



TABELA 4: Continuação

Espécie	Acesso <sup>1</sup>	2n	Nº de Indivíduos	Meiose			Número Total de Células
				Associações Diacinese e Metáfase I <sup>2</sup>	Anáfase I <sup>3</sup>	Outras	
<i>L. pallida</i>	78/92	112	2	56II (24), 1-2IV(10), 2I(1)	N(10)		45
	79/92	112	2	56II(4), 1-2IV(8), 2I(2)	R(1)	49	64
<i>L. macrophylla</i>	55/88	56	1	28II(1), 1-2IV(2), 2I(4), A(6), M(2), IR(27)	—	—	42
	83/87	56	3	28II(69), 1-2IV(11)	N(6)	42	128
<i>L. pulverulenta</i>	84/87	56	2	28II(35), 1-2IV(9), 2I(1)	N(45)	102	192
	22/86	56	1	28II(8), 1IV(1)	N(2)	46	57
<i>L. retusa</i>	23/86	52	1	26II(17), 2I(2), 1-3IV(8), 1M(1)	N(41), R(7)	66	142
<i>L. salvadorensis</i>	17/86		1	±50II(6), 1-2IV(10)	N(7)	01	24
<i>L. shannonii</i>	26/84	52	4	26II(14), 1-2IV(3), A(19), 1M(1), 2I(1)	N(1), R(2)	08	49
	135/92	56	1	28II(12), 2I(3), 1III(2), A(13)	P(1)	07	38
	141/92	52	3	26II(11), 1IV(3), IR(7)	—	02	23

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências, número de células entre parênteses.

<sup>3</sup> N, disjunção normal; D, disjunção irregular; R, presença de retardatários; P, pontes, número de células entre parênteses.

TABELA 4: Continuação

Espécie	Acesso <sup>1</sup>	2n	Nº de Indivíduos	Meiose			Número Total de Células
				Associações Diacinese e Metáfase I <sup>2</sup>	Anáfase I <sup>3</sup>	Outras	
<i>L. trichandra</i>	35/88	52	1	26II(13), 1IV(1)	--	28	42
	53/88	52	2	26II(26), 1-2IV(3)	N(14)	38	81
	03/91	52	2	26II(17), 1-2IV(6), 2I(1)	N(9), R(2)	64	99
	128/92	52	1	26II(14)	N(1)	30	45
	131/92	52	3	26II(51)	N(3)	77	131
	137/92	52	2	26II(15)	N(1)	35	51
	138/92	52	2	26II(28), 2I(1), 1M(1)	N(9)	79	118
<i>L. x spontanea</i>	98/94	104	2	52II(24), 1-4I(6), 1-2IV(11), 1M(8)	N(4)	16	61
<i>L. ? hybrid</i>	52/87	112	3	IR(109)	--	30	139

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências, número de células entre parênteses.

<sup>3</sup> N, disjunção normal; D, disjunção irregular; R, presença de retardatários; P, pontes, número de células entre parênteses.

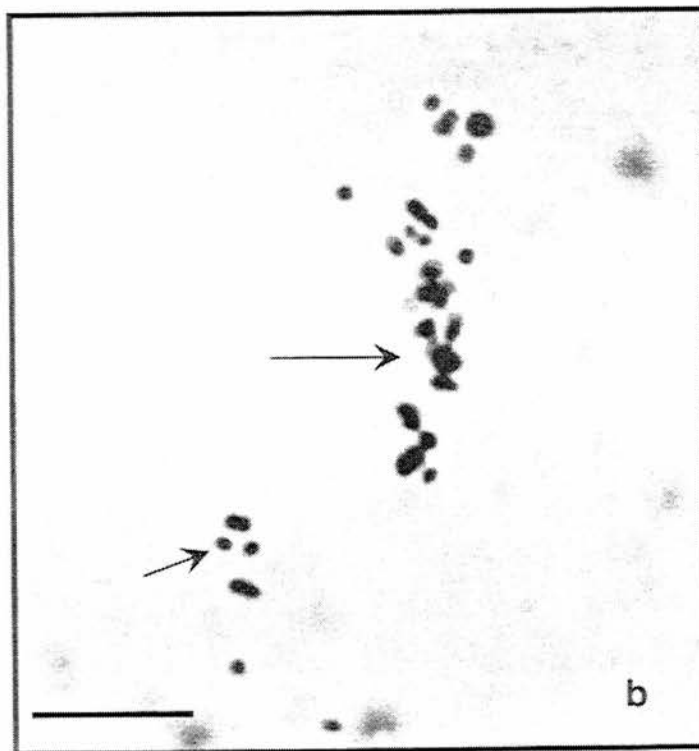
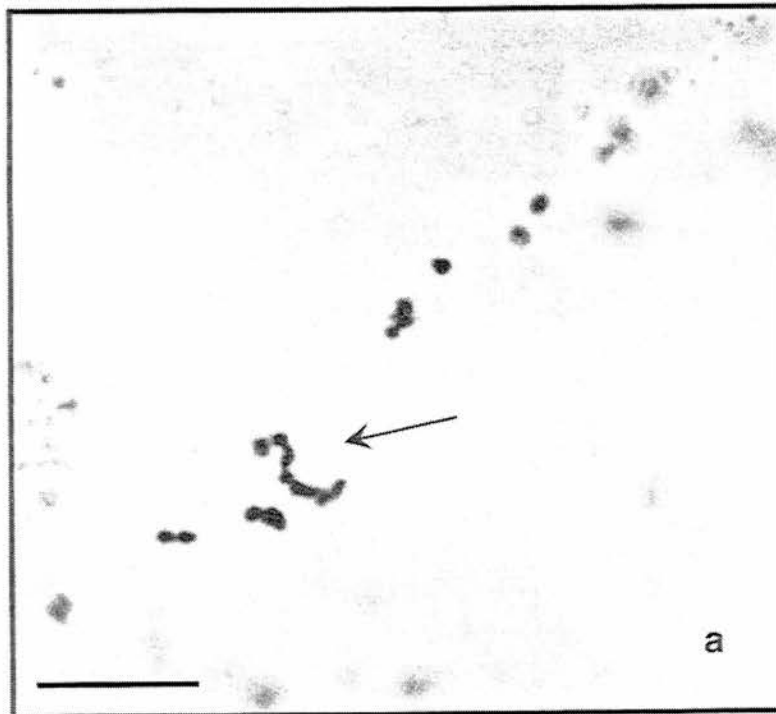


FIGURA 7- Metáfases I de *L. macrophylla* 55/88 (a) seta indicando multivalente (b) irregularidades, como multivalentes (seta maior) e separação precoce de cromátides (seta menor) . (Escala 10 $\mu$ m)

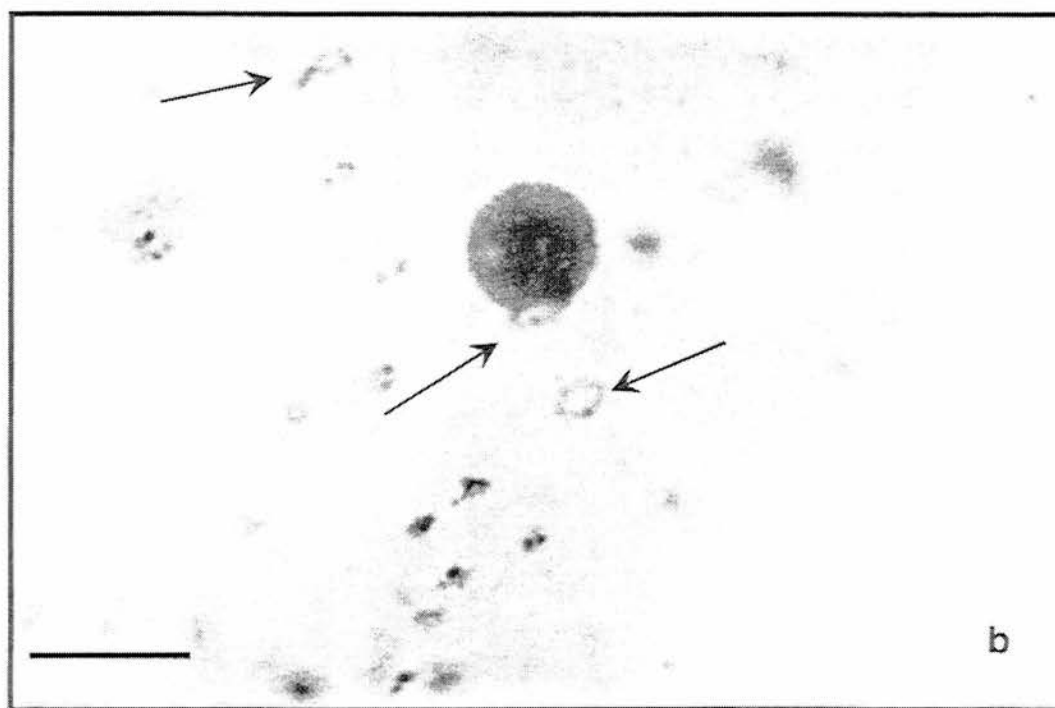
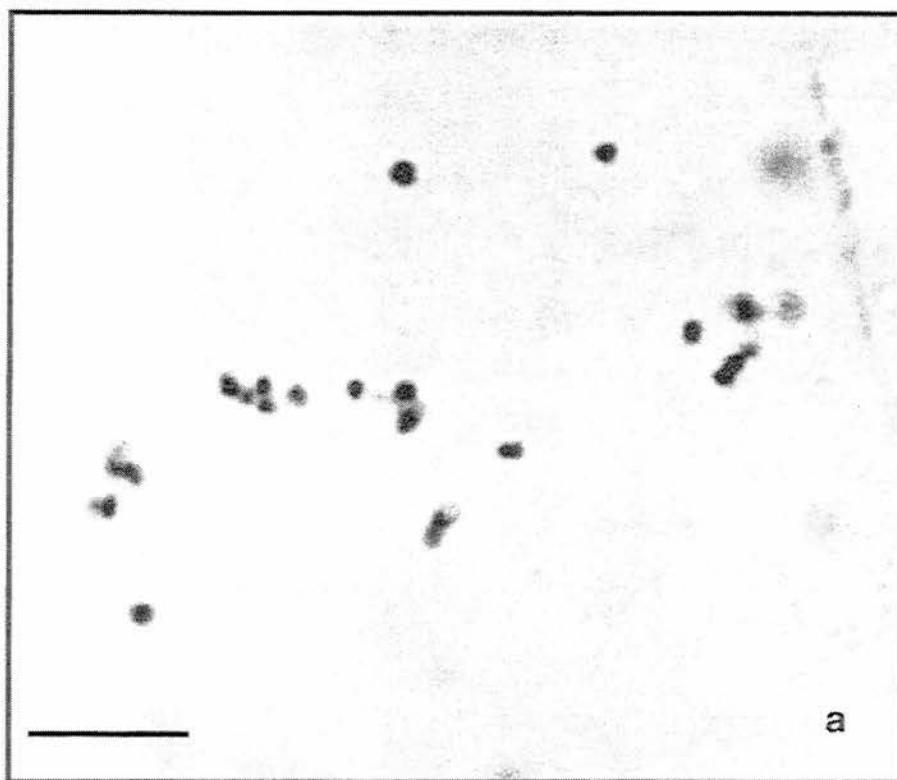


FIGURA 8 – *L. macrophylla* 55/88 (a) metáfase I b) diacinese, demonstrando as associações quadrivalentes (setas). (Escala 10 $\mu$ m)

estas irregularidades. Pan & Brewbaker (1988) estudando um acesso desta espécie verificou somente presença de bivalentes.

A análise de três acessos de *L. pulverulenta* (22/86, 83/87, 84/87) indica que esta espécie apresenta um comportamento meiótico predominantemente regular, com preferencial formação de bivalentes (Figura 9), embora a presença de associações IV tenha sido verificada em 16,4% das células analisadas em diacinese e metáfase I (Tabela 4). Meiose regular para poucos indivíduos (1 a 2) de *L. pulverulenta* também foi verificada por Gonzáles *et al.* (1967), Pan & Brewbaker (1988) e Freitas *et al.* (1988) somente com formação de bivalentes.

Em *L. retusa*, acesso 23/86, verificou-se a preferencial formação de bivalentes, mas a presença de algumas associações do tipo IV foi encontrada em 39,3% das células analisadas, como pode ser verificado na Tabela 4. Pan & Brewbaker (1988) analisando dois acessos desta espécie relataram somente associações do tipo bivalente. A Figura 10 apresenta células meióticas de *L. retusa*.

Para *L. salvadorensis*, acesso 17/86, esta foi a primeira análise meiótica realizada. De acordo com a Tabela 4, a presença de IV foi verificada em 62,5% das células analisadas em diacinese e metáfase I. As análises deste acesso revelaram a presença de aproximadamente 50II (Figura 11). Este resultado é intrigante, pois *L. salvadorensis* tem  $2n=56$  cromossomos (Cardoso *et al.*, 2000), sendo que esperava-se a formação de 28II, o que não ocorreu. Somente duas plantas, até o primeiro ano de coleta (1999) haviam sobrevivido, porém somente uma das plantas apresentou inflorescências com estádios

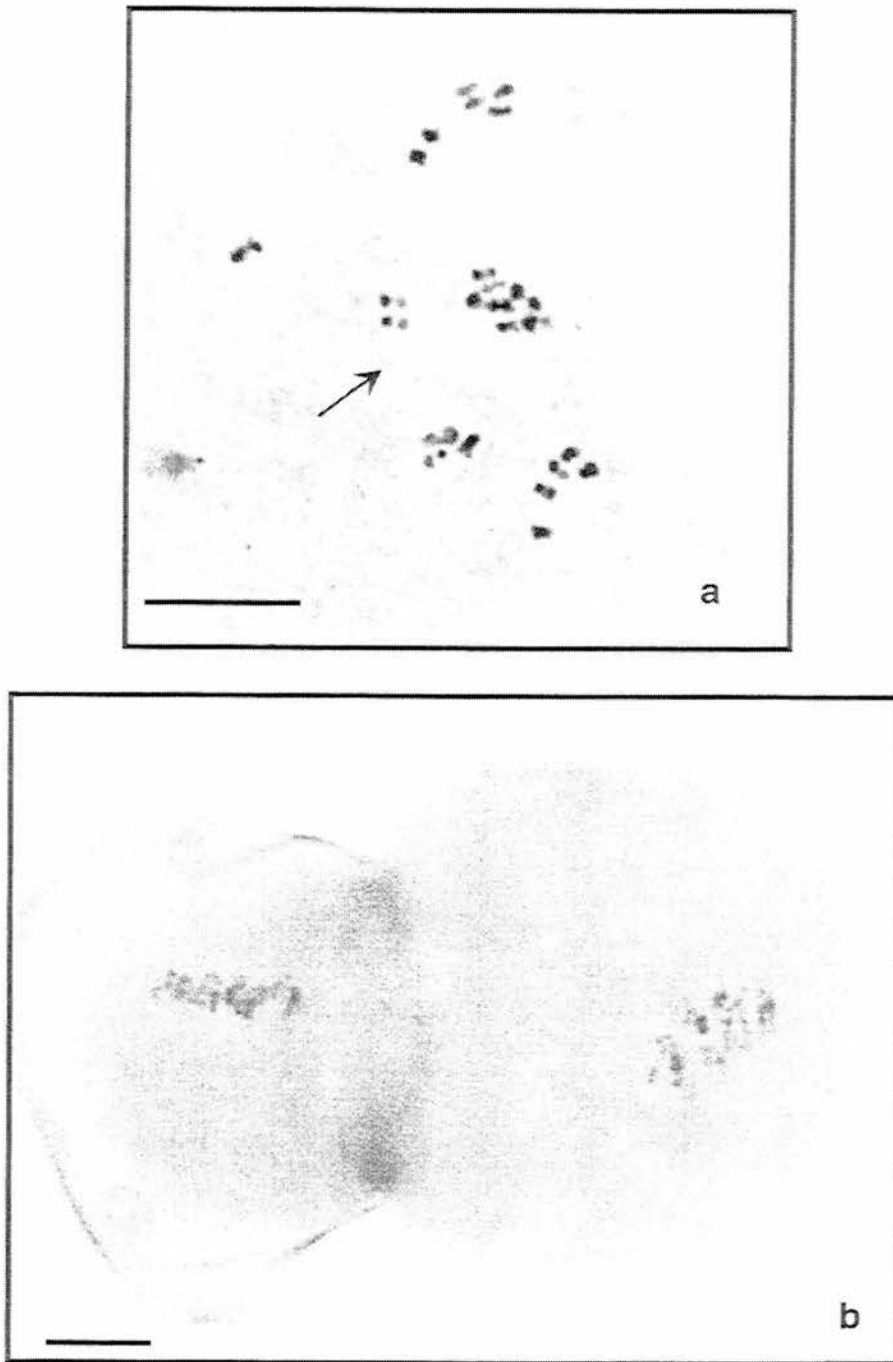


FIGURA 9- Células meióticas de *L. pulverulenta* (a) metáfase I do acesso 84/87, apresentando separação precoce de cromátides (seta) (b) metáfase II do acesso 83/87. (Escala 10 $\mu$ m)

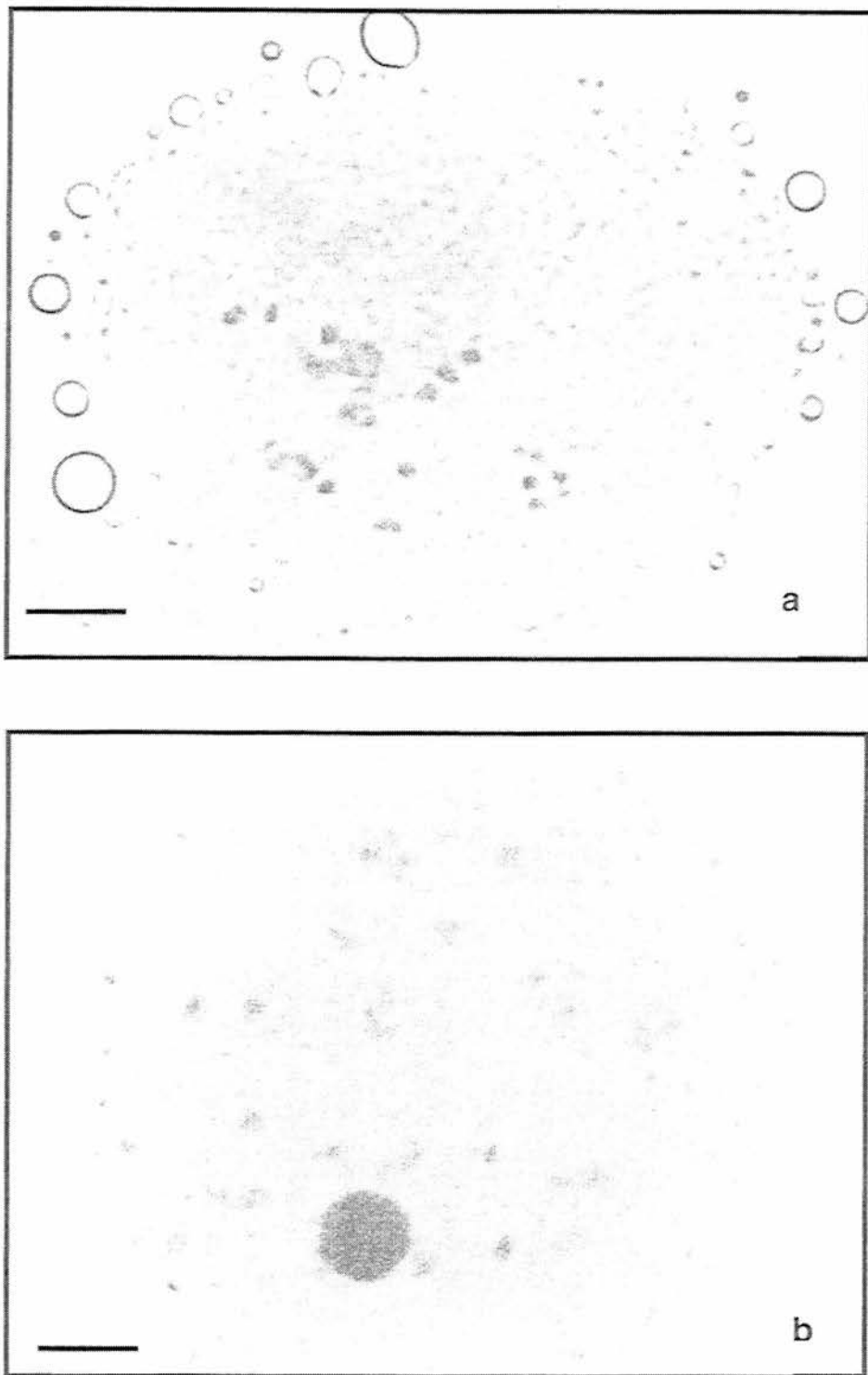


FIGURA 10- *L. retusa* 23/86 (a) metafase I (b) diacinese. (Escala 10 $\mu$ m)

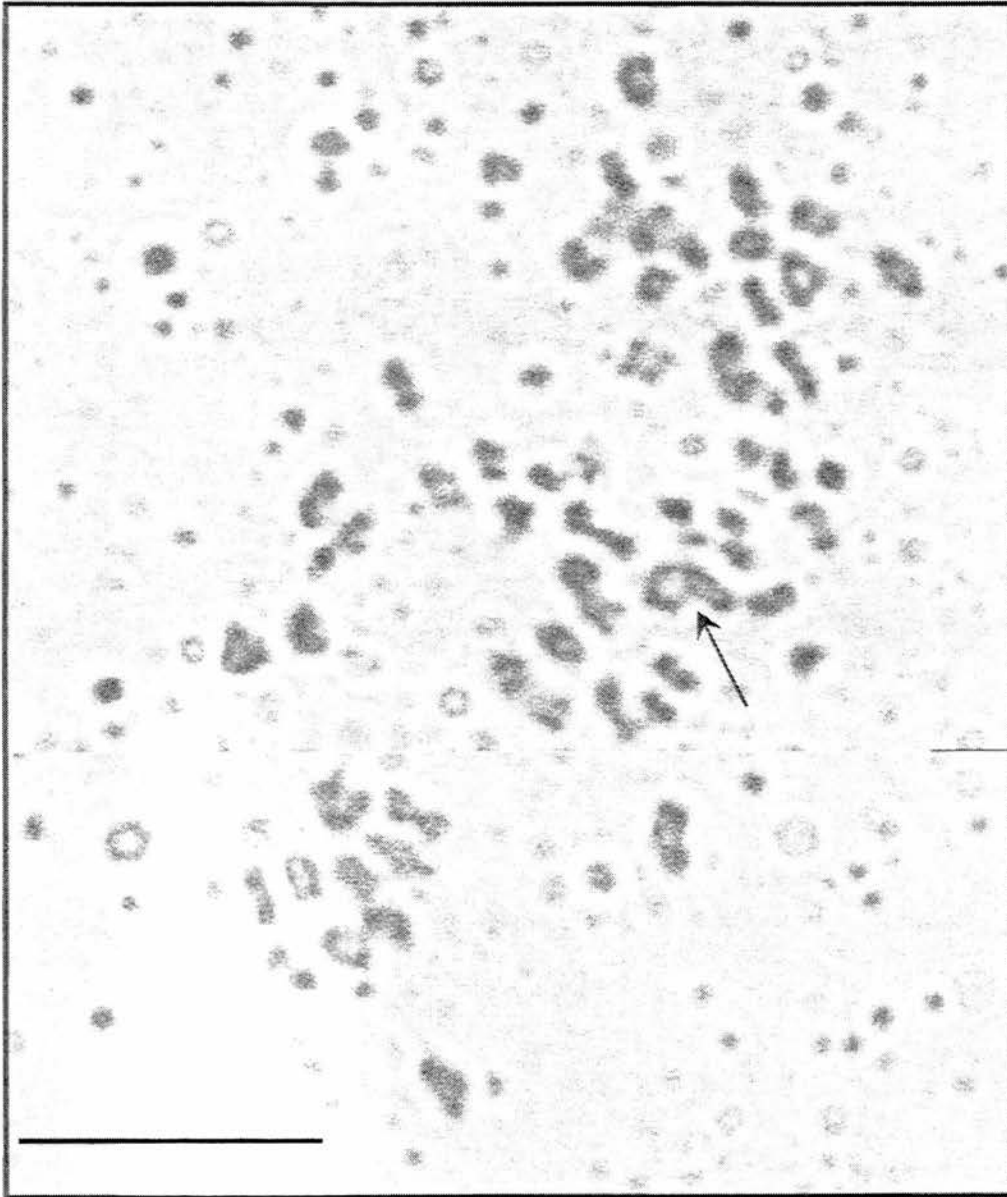


FIGURA 11— Metáfase I de *L. salvadorensis* apresentando multivalente (seta).  
(Escala 10µm)



meióticos, a qual foi analisada. Este  $2n$  maior que 100 pode ser resultado da troca de sementes, o que é difícil, pois segundo Kaminski (1998), esta planta é *L. salvadorensis* tipo ou estamos frente a um poliploide natural. Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) também observaram alguns poliplóides em *L. trichandra*, espécie normalmente diplóide.

O comportamento meiótico de *L. shannonii*, foi estudado nos acessos 26/84, 135/92 e 141/92 e as Figuras 12, 13 e 14 apresentam algumas células encontradas. Para o acesso 26/84 a meiose pode ser considerada irregular não tanto pela presença de associações do tipo IV e III na maioria das células em metáfase I (63,2%) (Tabela 4 e Apêndice 1), mas pela freqüente separação precoce de cromátides observadas já em metáfase I. Também foi verificada a presença de cromossomos retardatários em anáfase I. O acesso 135/92 também apresentou uma alta freqüência (60%) de associações do tipo III e IV em metáfase I e a presença de pontes em anáfase I. A análise de três indivíduos do acesso 141/92 indicou que este acesso apresenta meiose regular, com preferencial formação de bivalentes. No entanto, um indivíduo (Apêndice 1) apresentou 28II em metáfase I, diferenciando-se dos outros indivíduos do mesmo acesso que apresentaram 26II. A freqüente presença de outras associações que não bivalentes diferencia-se dos resultados de Pan & Brewbaker (1988), que para dois acessos da mesma espécie encontrou somente formação de cromossomos bivalentes.

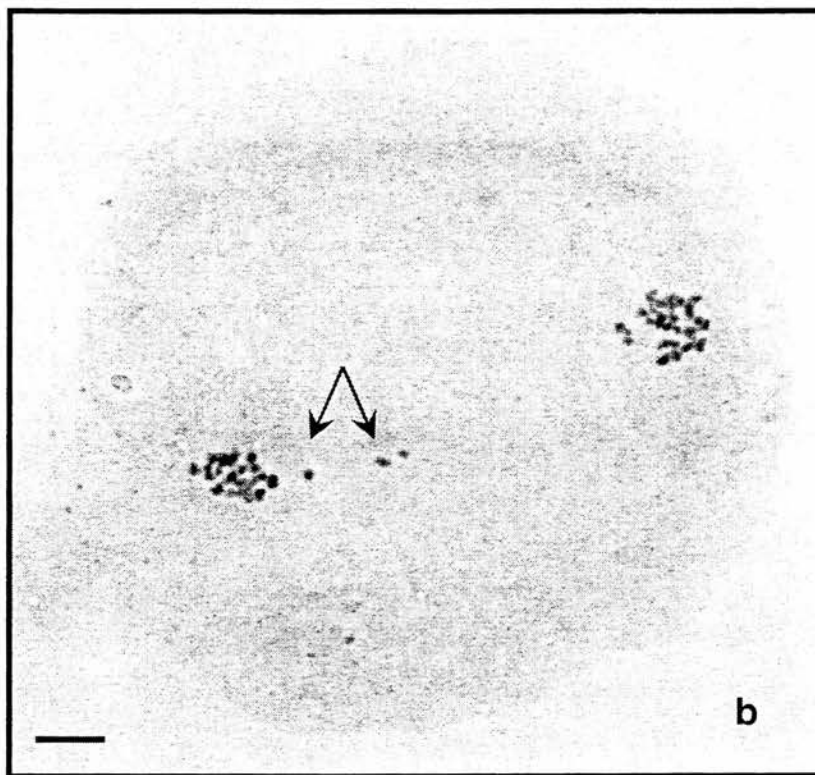


FIGURA 12– *L. shannonii* 26/84 (a) metáfase I, apresentando multivalentes (seta), (b) telófase I, com cromossomos retardatários (setas). (Escala 10 $\mu$ m)

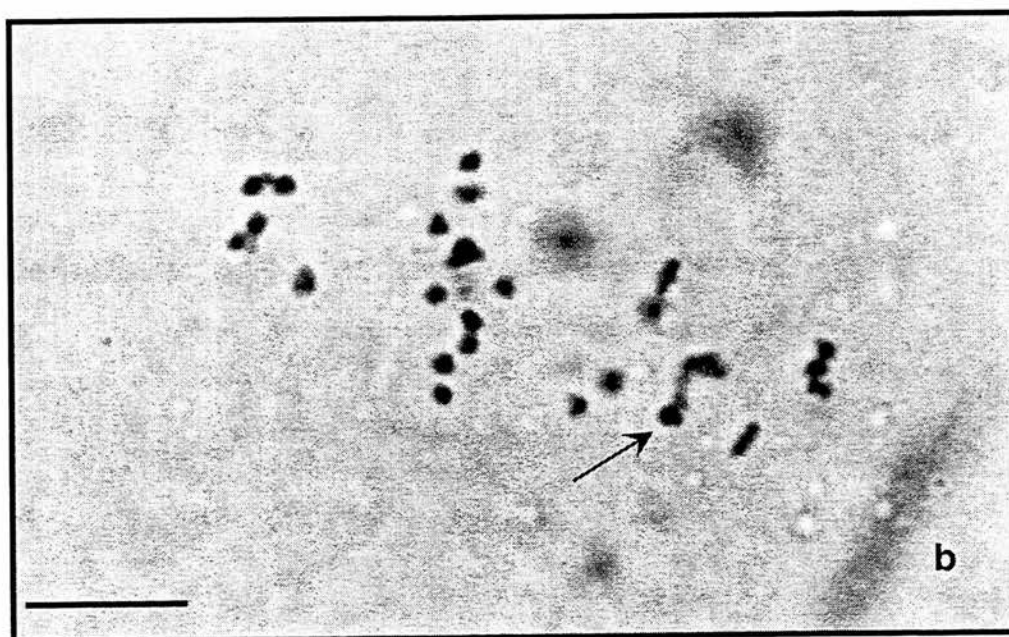
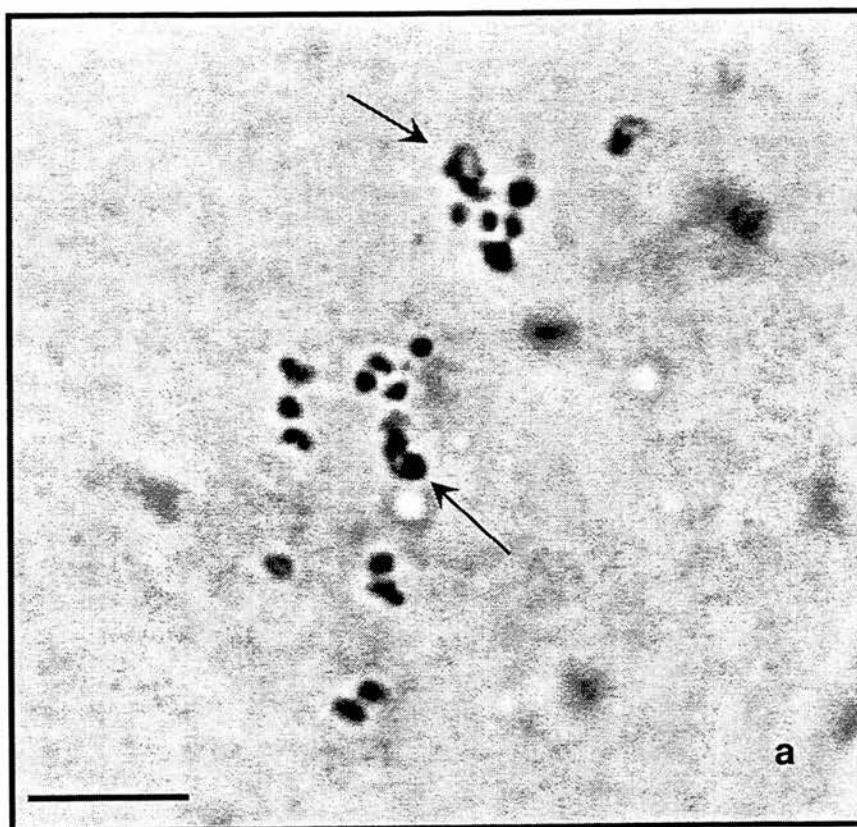


FIGURA 13– Metáfases I irregulares de *L. shannonii* 141/92, apresentando multivalentes e outras associações não identificadas (setas). (Escala 10 $\mu$ m)

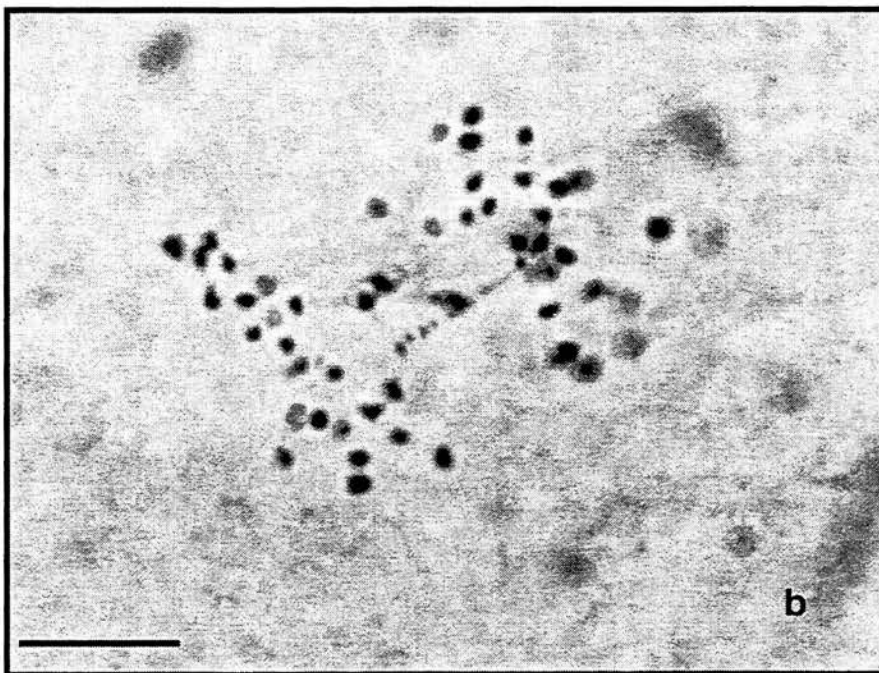
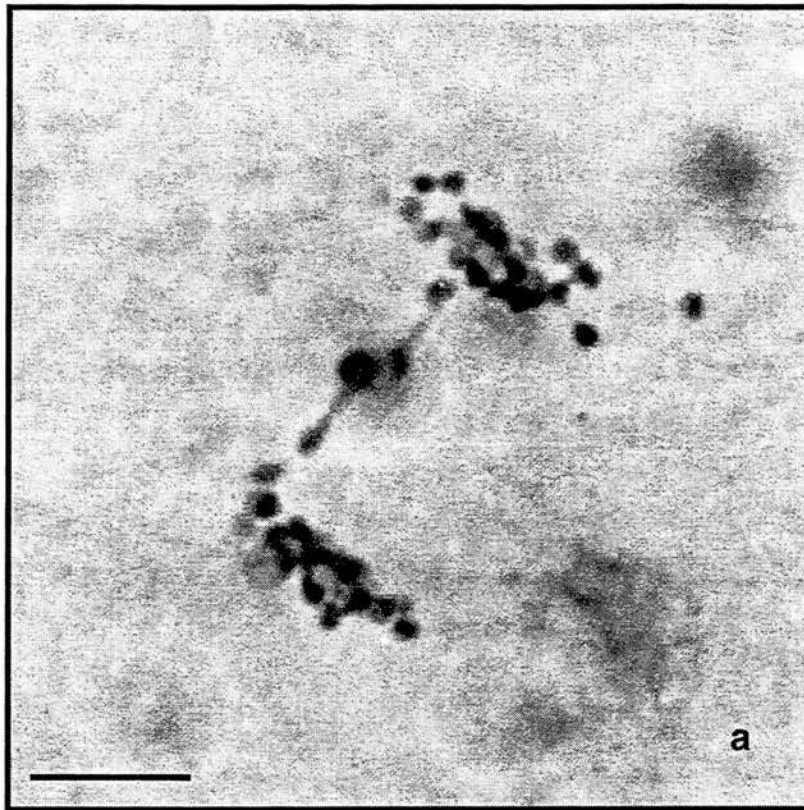


FIGURA 14 – Anáfases I irregulares de *L. shannonii* (a) acesso 141/92  
(b) acesso 135/92. (Escala 10 $\mu$ m)

Neste trabalho, os sete acessos analisados de *L. trichandra* apresentaram preferencial formação de bivalentes (em 92,7% das células analisadas) (Tabela 4), no entanto, mesmo com baixa frequência, em alguns acessos, foi verificada a presença de associações do tipo IV. Algumas fases meióticas de *L. trichandra* podem ser visualizadas nas Figuras 15, 16 e 17. Gonzáles *et al.* (1967), Freitas *et al.* (1988) e Pan & Brewbaker (1988) estudando a meiose desta espécie, também, verificaram regularidade meiótica, com formação de 26II. Com exceção do trabalho de Pan & Brewbaker (1988), que analisaram 13 acessos de *L. trichandra*, os demais autores analisaram poucos indivíduos (entre 1 e 4).

Os dados aqui apresentados, pela primeira vez mostram que a ocorrência de IV é maior do que a esperada, o que representa possível origem paleopoliplóide destas espécies, ou seja, que as espécies consideradas diplóides são, na verdade, remanescentes de um ciclo de poliploidização anterior. Goldblatt (1981) sugeriu para a subfamília Mimosoideae um baixo número cromossômico básico ( $x=14$ ), o que não é verificado nas espécies de *Leucaena* que possuem dois números básicos  $x=26$  e  $x=28$ , que são praticamente o dobro do apresentado para a maioria das espécies do grupo. Este alto número básico observado no gênero, reforça a hipótese de que as espécies diplóides possam ser poliplóides antigos que ao longo da história evolutiva sofreram inúmeras alterações no genoma e hoje se comportam como diplóides. Sttebins (1971) comenta que muitas espécies vegetais consideradas diplóides são na verdade, poliplóides antigos.

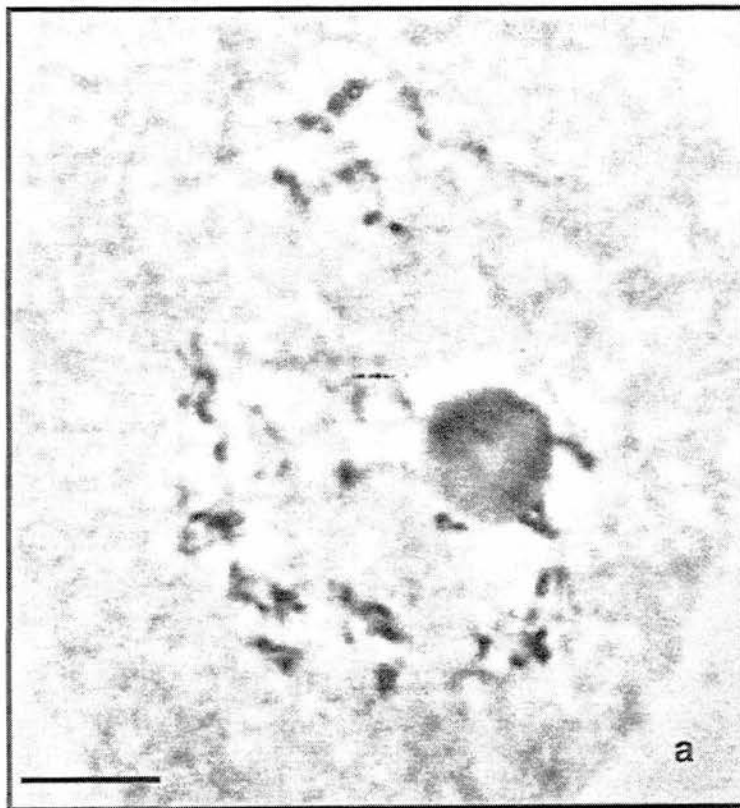


FIGURA 15 – Paquetes de *L. trichandra* 138/92. (Escala 10 $\mu$ m)

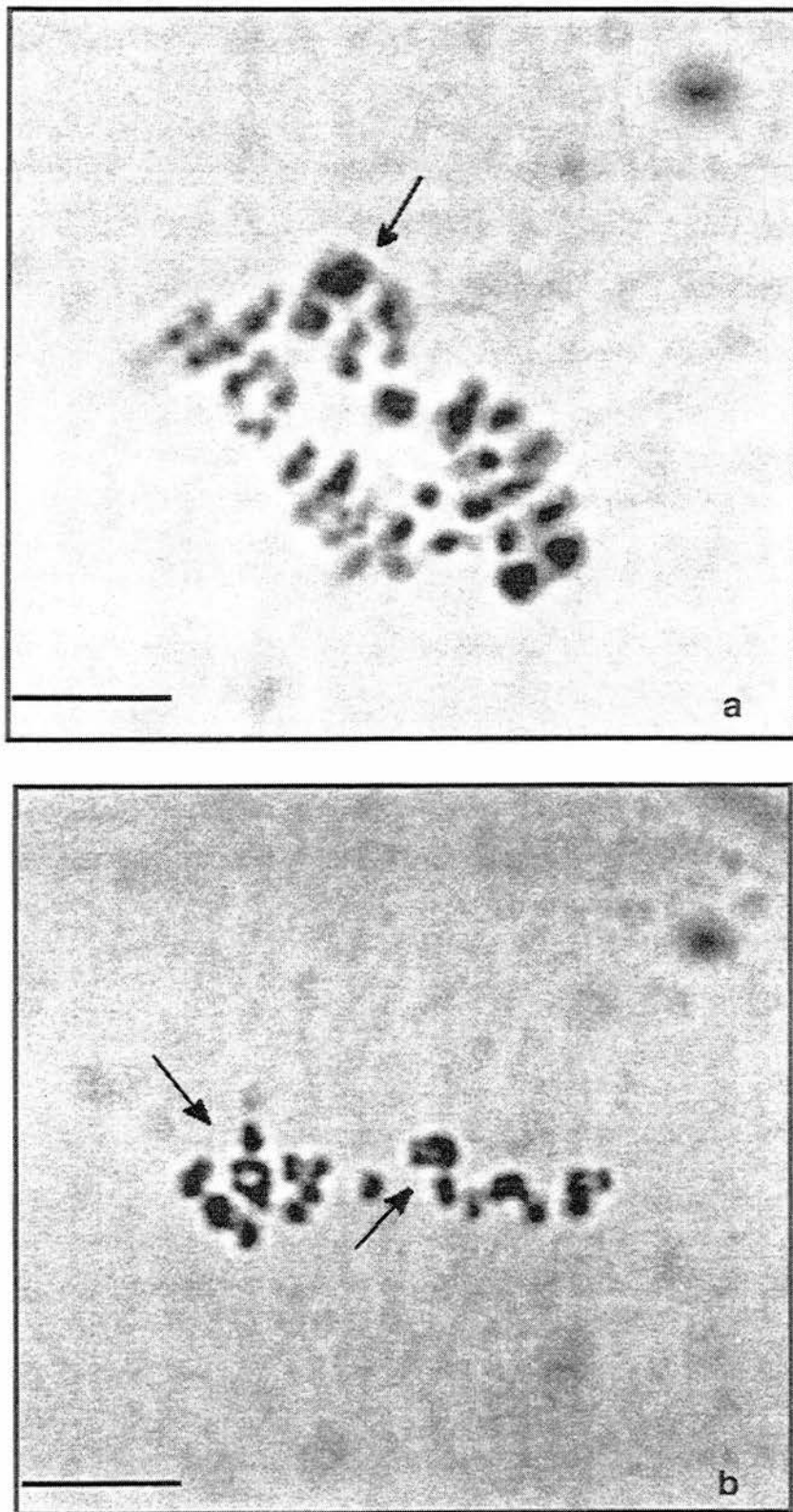


FIGURA 16- Metáfases I de *L. trichandra* apresentando irregularidades como associações múltiplas (setas) (a) acesso 35/88 (b) acesso 138/92. (Escala 10 $\mu$ m)

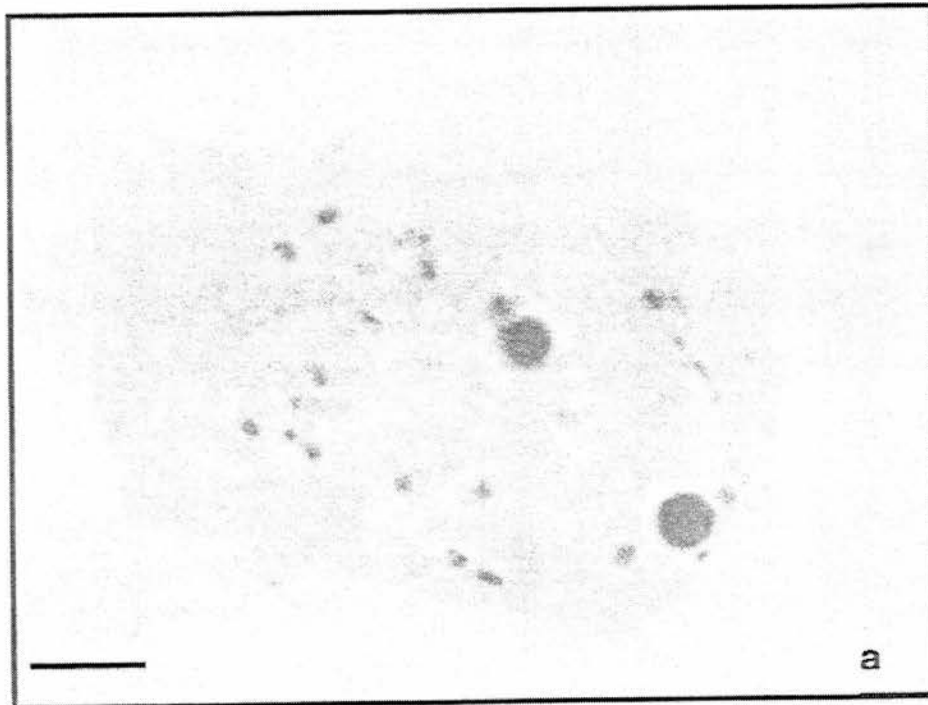


FIGURA 17 – *L. trichandra* 131/92 (a) diacinese, apresentando 2 nucléolos  
b) metáfase II. (Escala 10 $\mu$ m)



#### 4.1.2. Comportamento meiótico das espécies tetraplóides e híbridos

As espécies tetraplóides estudadas foram *L. confertiflora*, *L. diversifolia*, *L. involucrata*, *L. leucecephala glabrata*, *L. leucocephala leucocephala*, *L. pallida* e os híbridos *L. x spontanea* e *L. ? hybrid*. Para a maioria das espécies o comportamento meiótico pode ser considerado regular, com preferencial formação de bivalentes. No entanto, uma frequência considerável de associações do tipo quadrivalentes foi observada e pela primeira vez reportada.

*L. confertiflora*, acesso 119/92, apresentou 56II em 78,3% das células analisadas, podendo ser considerada meioticamente estável. Entretanto, 21,7% das células analisadas em metáfase I apresentaram associações do tipo IV, III e alguns I em uma mesma célula. A Figura 18 demonstra algumas células metafásicas desta espécie. Para esta *L. confertiflora*, estes são os primeiros dados referentes a meiose e poderão auxiliar em futuras investigações sobre a origem da espécie.

Os nove acessos estudados de *L. diversifolia* (Tabela 4, Figuras 19, 20, 21, 22 e 23) indicam que esta espécie apresenta comportamento meiótico regular, com formação predominante (91,9%) de 52II em diacinese e metáfase I. Alguns acessos apresentaram I, III, IV e alguns multivalentes, indicando que existe alguma homologia entre os genomas das espécies progenitoras. Os resultados encontrados discordam dos obtidos por Freitas *et al.* (1988), que estudando cinco indivíduos desta espécie encontrou somente formação de bivalentes. A presença de quadrivalentes foi verificada ocasionalmente por Pan

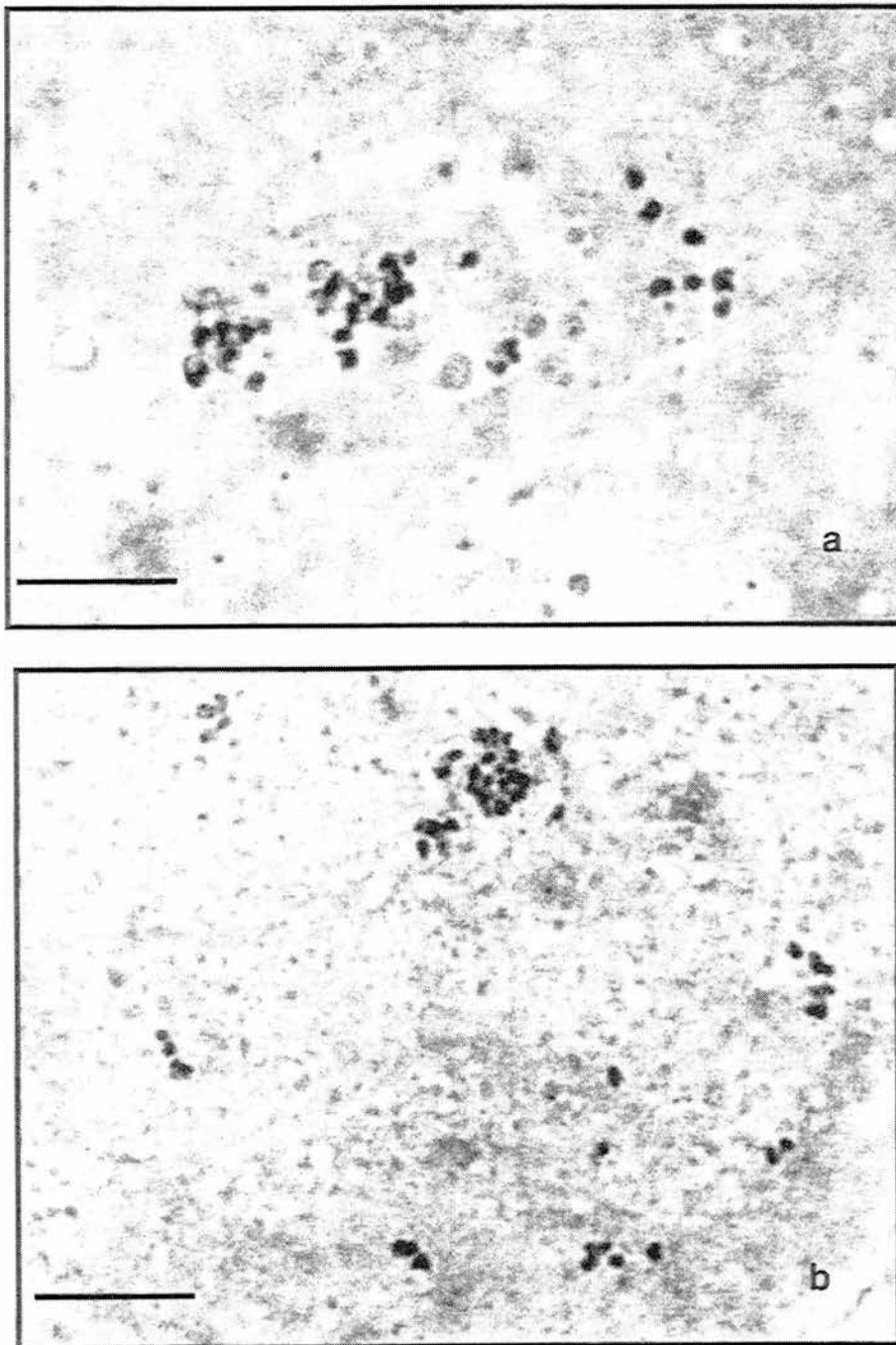


FIGURA 18 – *L. confertiflora* 119/92. (a) e (b) mostram metáfases I, com sobreposição dos cromossomos e citoplasma gorduroso. (Escala 10 $\mu$ m)

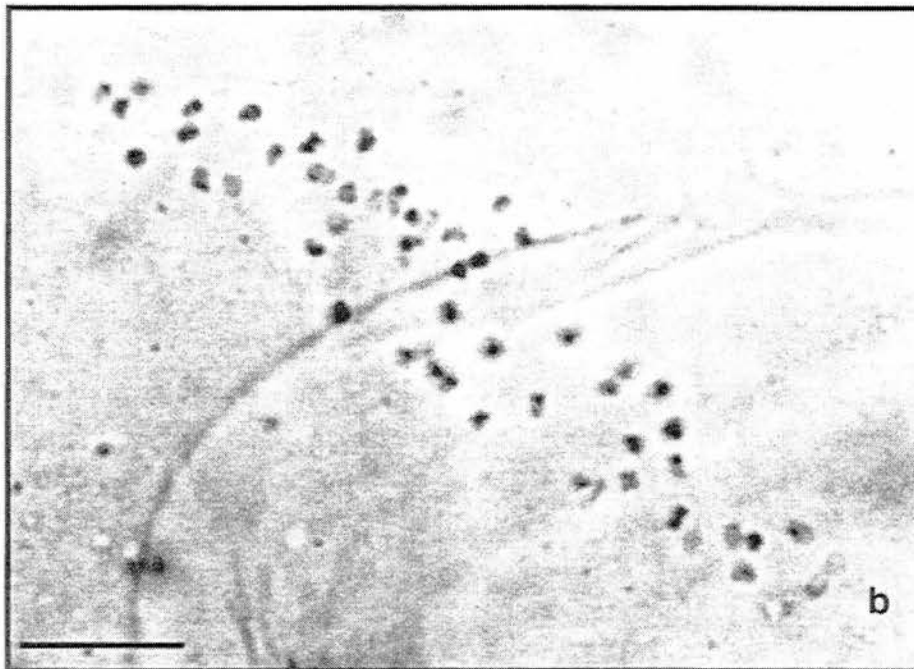
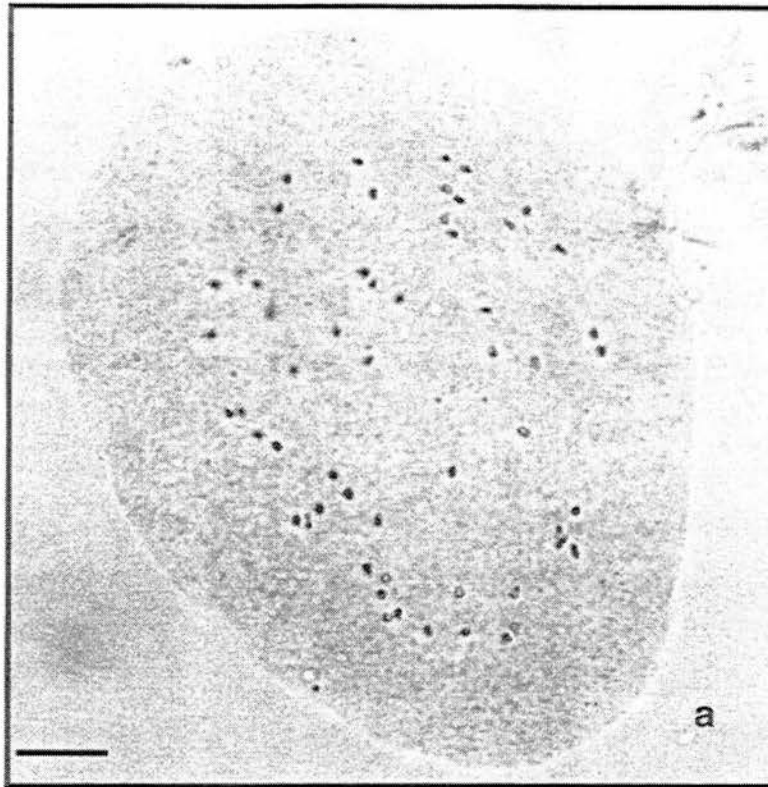


FIGURA 19— *L. diversifolia* 45/87 (a) diacinese (b) metáfase I, apresentando somente bivalentes. (Escala 10 $\mu$ m)

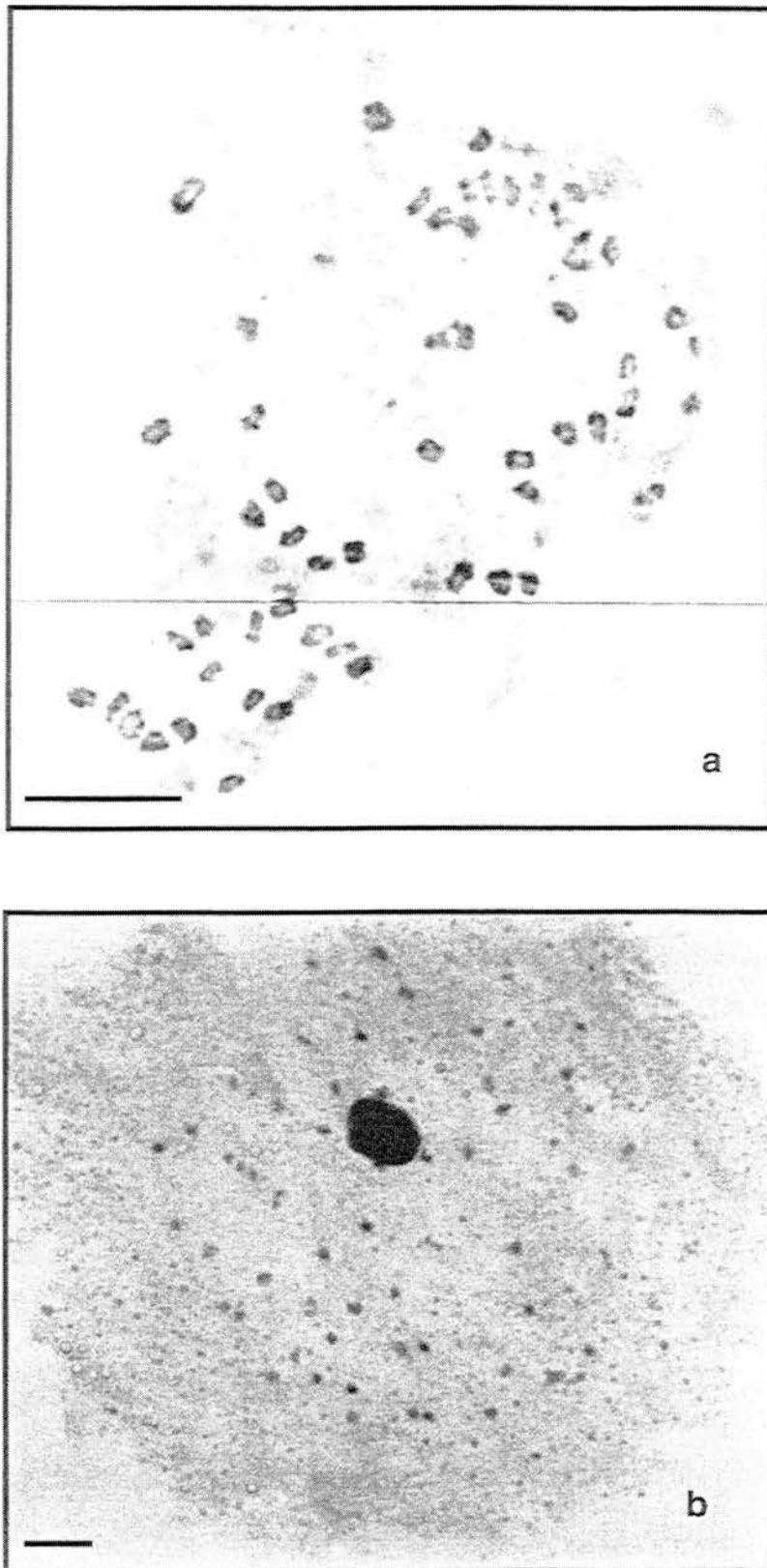


FIGURA 20– *L. diversifolia* 83/92 (a) metafase I (b) diacinese.(Escala 10 $\mu$ m)

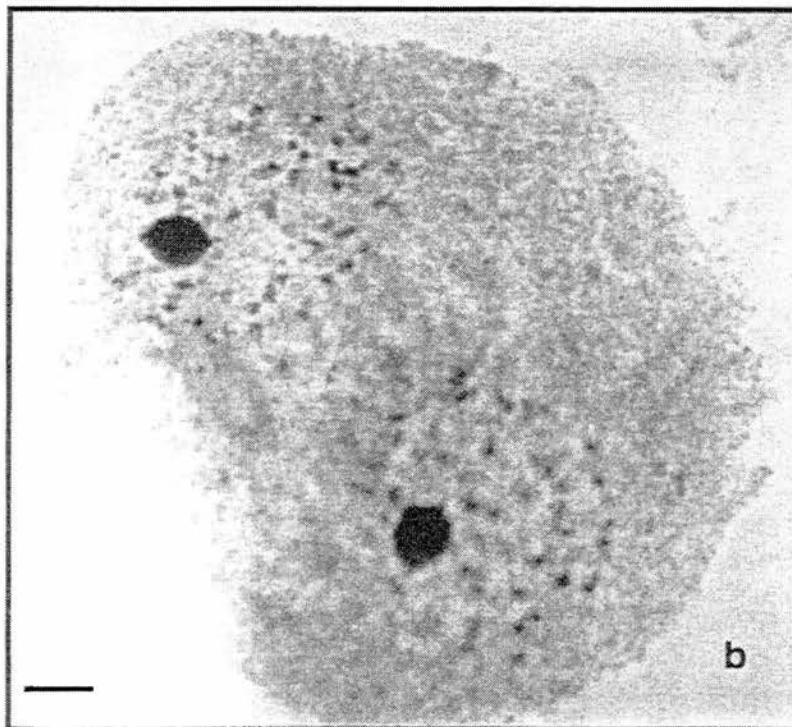
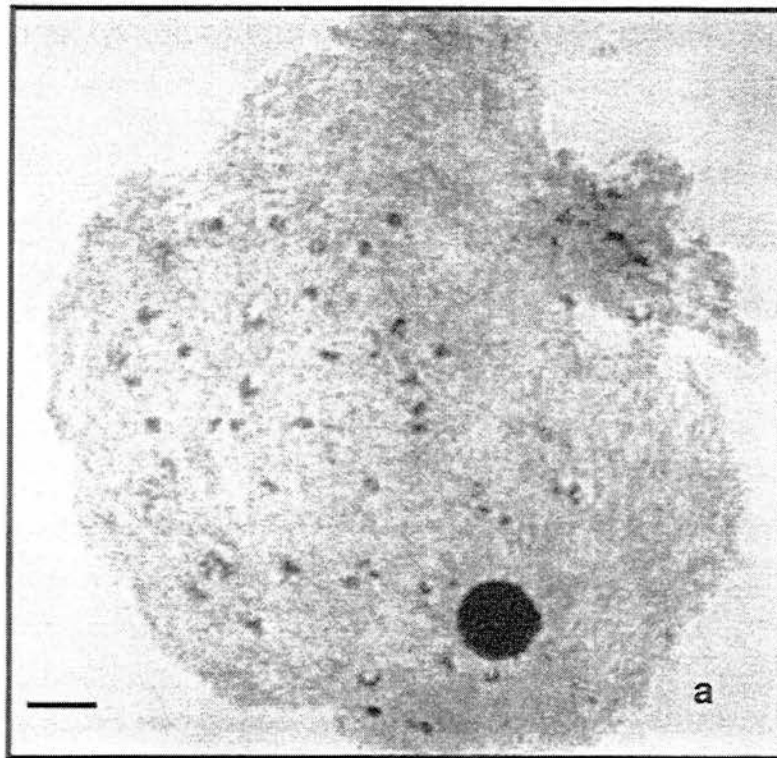


FIGURA 21— *L. diversifolia* 82/92 (a) diacinese (b) prófase II. (Escala 10 $\mu$ m)

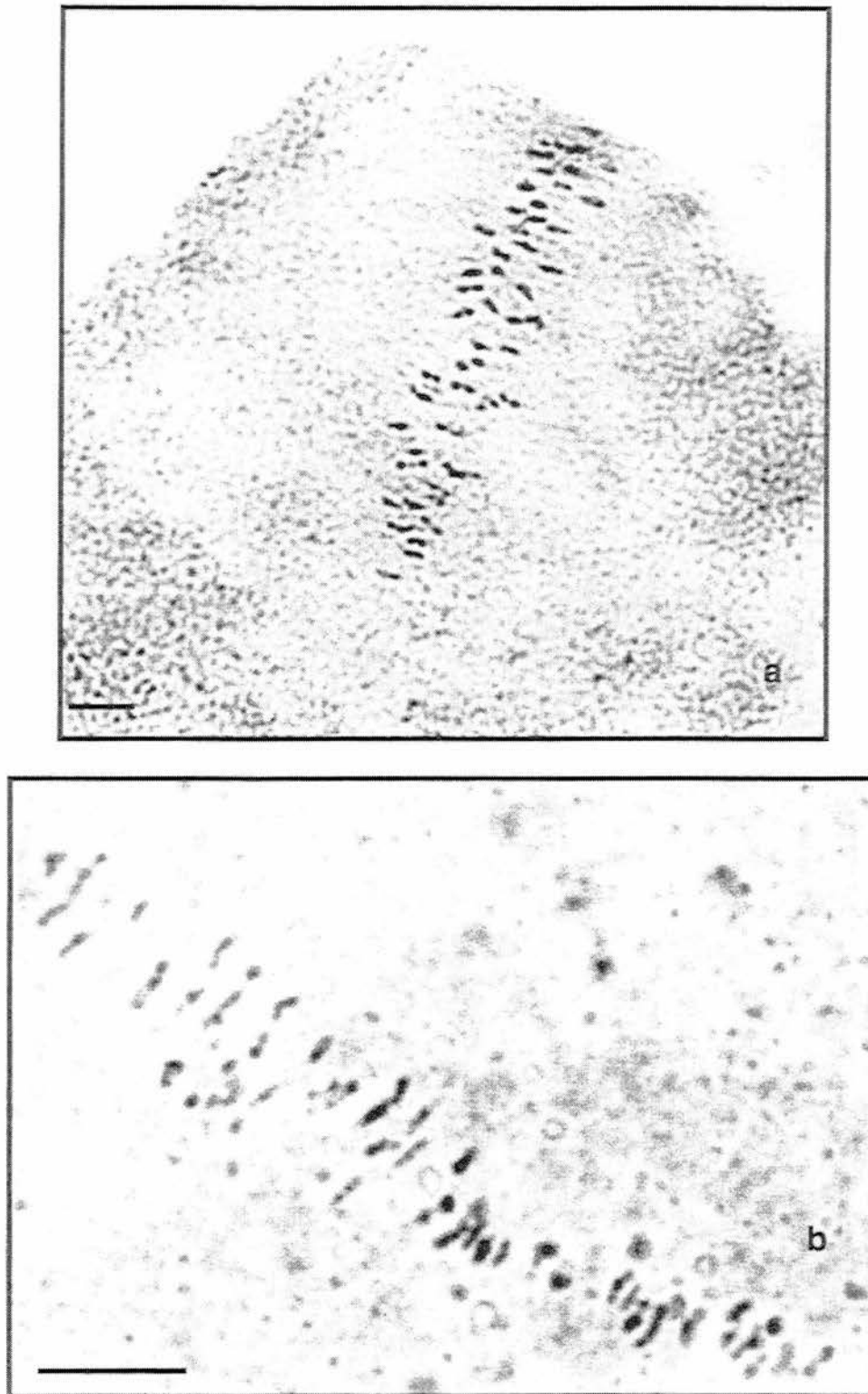


FIGURA 22 – Metáfases I regulares de *L. diversifolia* 105/94. (Escala 10 $\mu$ m)

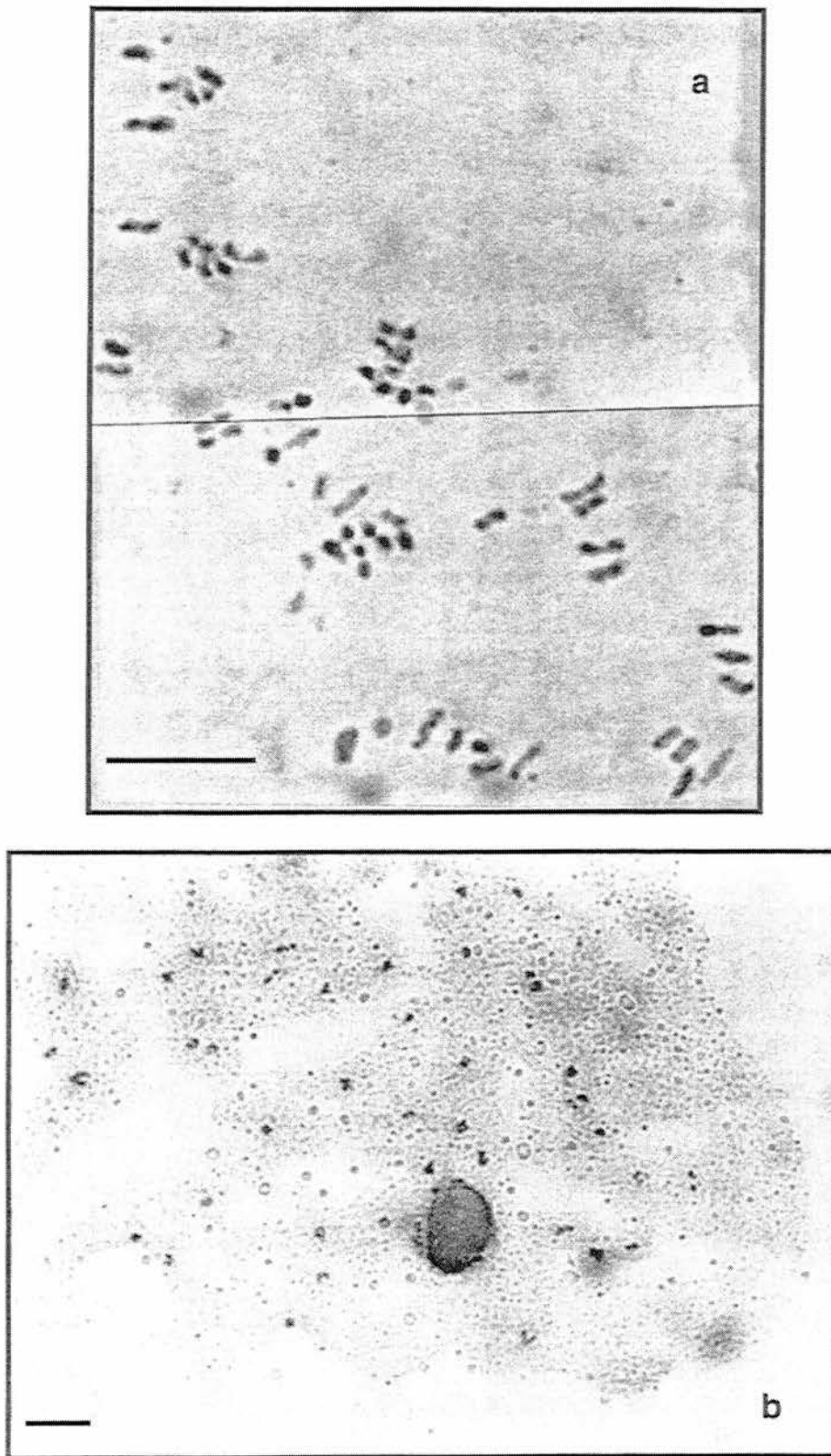


FIGURA 23— *L. diversifolia* (a) acesso 01/90 - metáfase I (b) acesso 106/94 - diacinese. (Escala 10 $\mu$ m)

& Brewbaker (1988), que estudaram doze de *L. diversifolia*, sugerindo que a espécie possa ter surgido por autoploidia. No entanto, análises de cpDNA e morfológicas indicam que esta espécie é um alopoliplóide, cujas espécies progenitoras sejam possivelmente *L. pulverulenta* e *L. trichandra* (Hughes, 1998c). Neste caso, a presença de quadrivalentes sugere uma homologia entre os genomas dos progenitores ou que tenham ocorrido translocações.

*L. involucrata*, acesso 87/92, apresentou em 55% das células analisadas, em metáfase I, configurações do tipo I, III, IV e outras não identificadas, além de bivalentes (Figuras 24 e 25). Estas são as primeiras informações sobre o comportamento meiótico dessa espécie.

Entre as espécies tetraplóides, *L. leucocephala* é mais estudada citogeneticamente (Gonzales *et al.*, 1967; Freitas *et al.*, 1988; Pan e Brewbaker, 1988). Neste trabalho, foram estudados onze acessos de *L. leucocephala* ssp. *glabrata* e um acesso da subespécie *leucocephala* (Tabela 4).

Para *L. l. glabrata* os resultados indicam que os acessos pertencentes a esta subespécie apresentam preferencial formação de bivalentes (em 83% das células), mas com presença variável de quadrivalentes e/ou multivalentes. Nos acessos 19/81 e 32/88 foram observadas as maiores freqüências de associações do tipo IV (Tabela 4). Em *L. l. leucocephala* 133/92, o mesmo comportamento foi observado. Estes resultados encontrados para *L. leucocephala* discordam dos dados encontrados por Gonzáles *et al.* (1967), Freitas *et al.* (1988) e Pan & Brewbaker (1988), que estudaram a



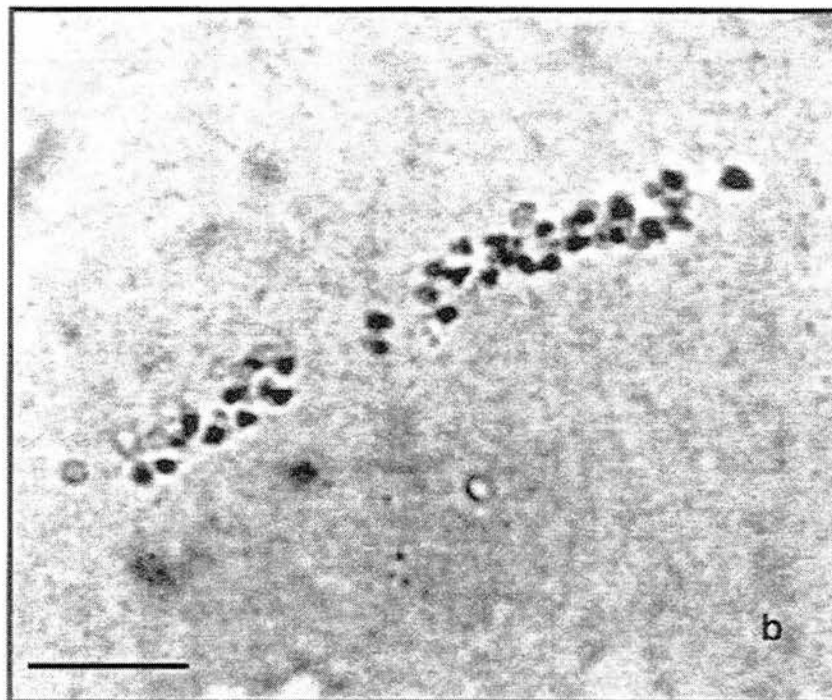
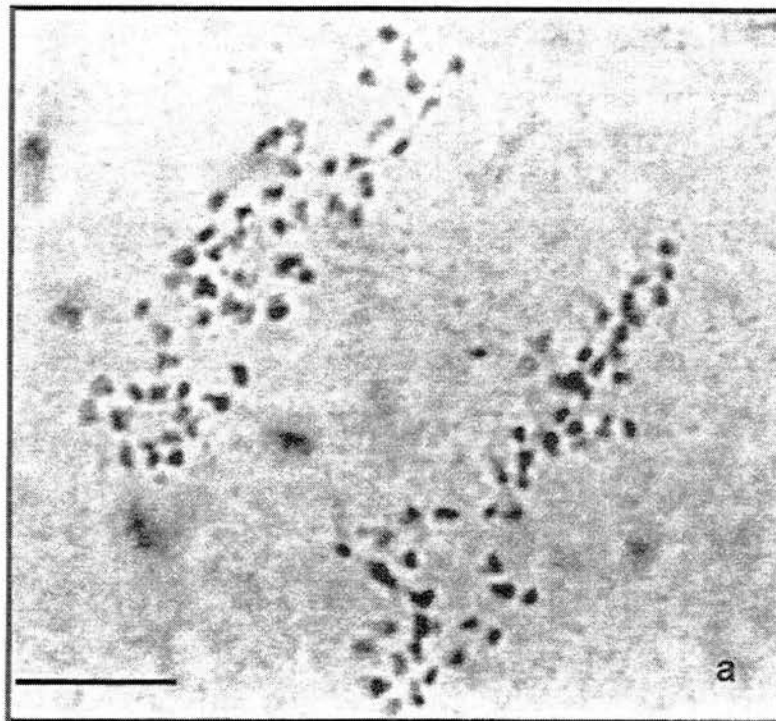


FIGURA 24– *L. involucrata* 87/92 (a) anáfase I regular (b) metáfase I regular.  
(Escala 10 $\mu$ m)

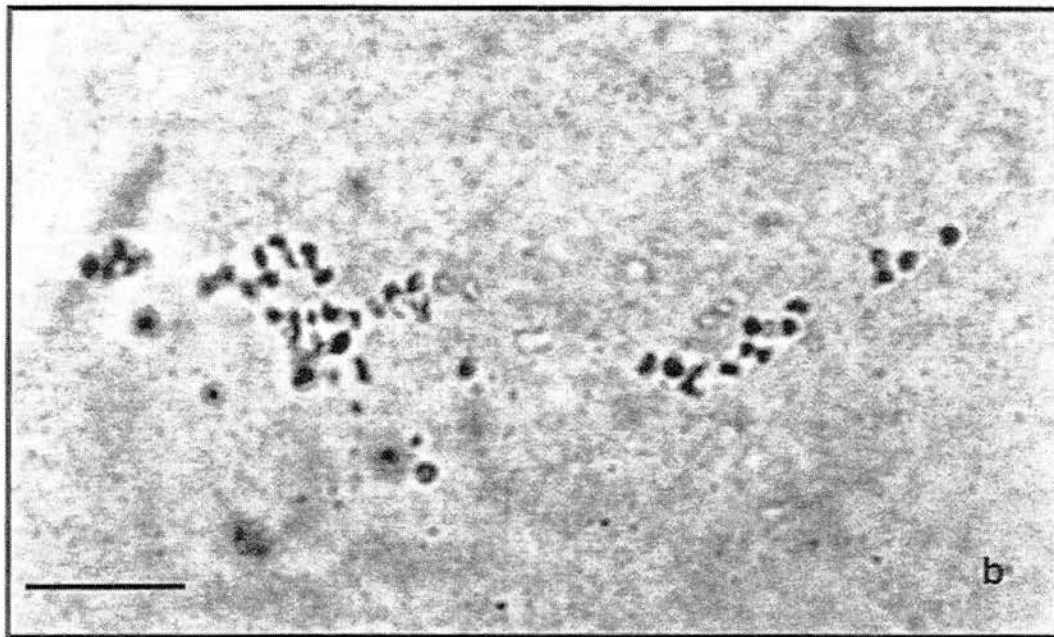
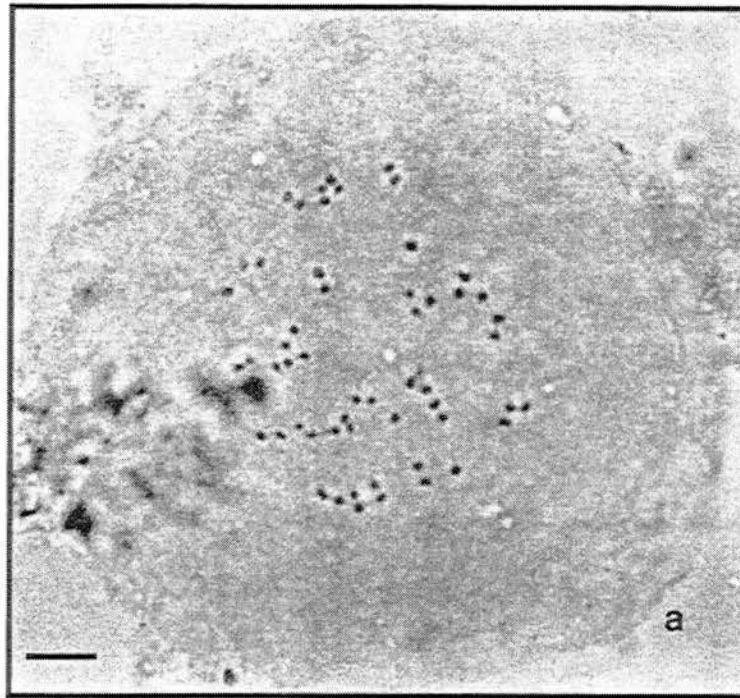


FIGURA 25- *L. involucrata* 87/92 (a) diacinese (b) metáfase I. (Escala 10 $\mu$ m)

meiose desta espécie (entre 1 e 5 indivíduos) e encontraram somente formação de bivalentes.

Neste trabalho, das 327 células em diacinese ou metáfase I analisadas para a espécie *L. leucocephala*, 47 células (cerca de 14,36%) apresentaram quadrivalentes e/ou multivalentes. A presença destas configurações pode refletir associações entre os genomas das espécies progenitoras, já que dados de cpDNA confirmam origem alopoliplóide de *L. leucocephala* (Harris *et al.*, 1994a; Hughes, 1998c). As Figuras 26, 27, 28, 29, 30 e 31 caracterizam o comportamento meiótico desta espécie.

*L. pallida* apresentou comportamento meiótico regular, sendo predominante associações do tipo bivalentes, em diacinese e metáfase I, no acesso 78/92 (Tabela 4, Figuras 32 e 33). No entanto, a presença de quadrivalentes foi verificada em 57% das células analisadas do acesso 79/92. *L. pallida* é considerada um alotetraplóide (Hughes *et al.*, 1994a), neste caso os IV encontrados seriam resultado de pareamento homeólogo entre os genomas progenitores. Origem alopoliplóide já havia sido sugerida à espécie por Pan & Brewbaker (1988), que estudando três acessos observaram apenas formação de bivalentes.

Para *L. x spontanea*, acesso 98/94, a formação de 52II foi encontrada na maioria das células. Entretanto, foi verificada a presença de 1 a 2 quadrivalentes em 22% das células analisadas e, também a presença de multivalentes em 16% das células analisadas (Tabela 4, Figuras 34 e 35). Freitas *et al.* (1988; 1991) estudando a meiose de híbridos artificiais entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia* verificaram pareamento muito regular com

formação preferencial de bivalentes. No entanto, freqüências variáveis de I, III e IV foram registradas. Pan & Brewbaker (1988) também estudando híbridos artificiais entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia* verificaram, em metáfase I, somente formação de bivalentes.

*L. ? hybrid*, acesso 52/87, apresentou várias irregularidades (Tabela 4, Apêndice 1). Todas as células analisadas apresentaram a formação de bivalentes, quadrivalentes, trivalentes, univalentes e multivalentes com freqüência variável de cada configuração (Figura 36). Além destes tipos de irregularidade, em algumas células os cromossomos pareciam estar separados em dois grupos (Figura 37). Também foi verificada a presença de aderência entre os cromossomos bem como separação precoce de cromátides já em metáfase I. Em várias células em diacinese foi verificada a fissão dos nucléolos como pode ser visto na Figura 38.

Para as espécies tetraplóides estudadas, os dados aqui apresentados mostram a freqüente ocorrência de quadrivalentes em metáfase I. Estes dados apóiam a teoria de que os poliplóides se originaram por aloploidia sendo resultado da hibridação entre duas espécies com algum grau de similaridade, podendo ser considerados como aloploidos segmentares. Segundo Guerra (1988), este é o caso mais freqüente na evolução, já que a hibridação é mais comum entre subespécie ou espécies muito próximas.

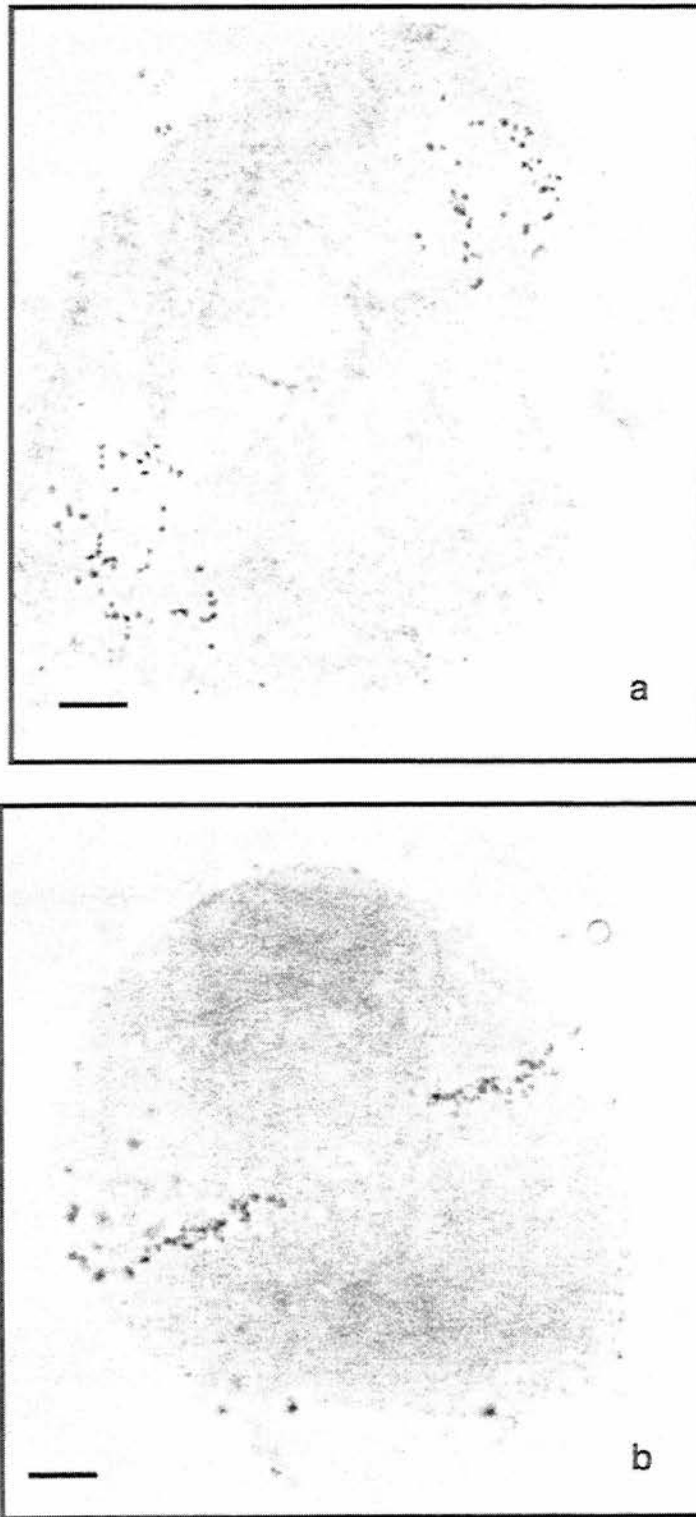


FIGURA 26– Metáfases II de *L. l. glabrata* 34/92. (Escala 10 $\mu$ m)

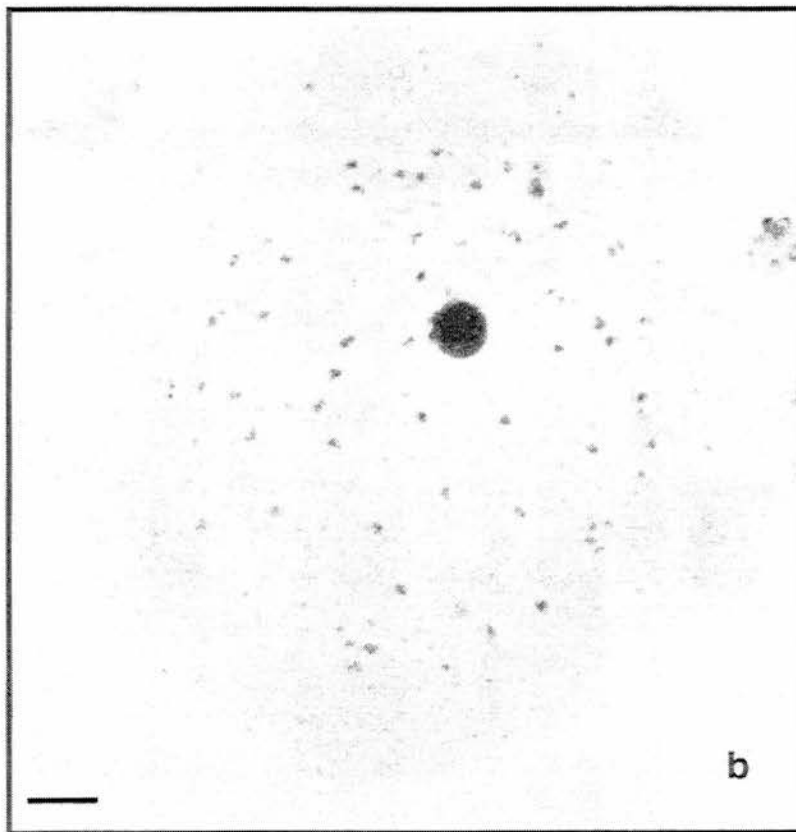
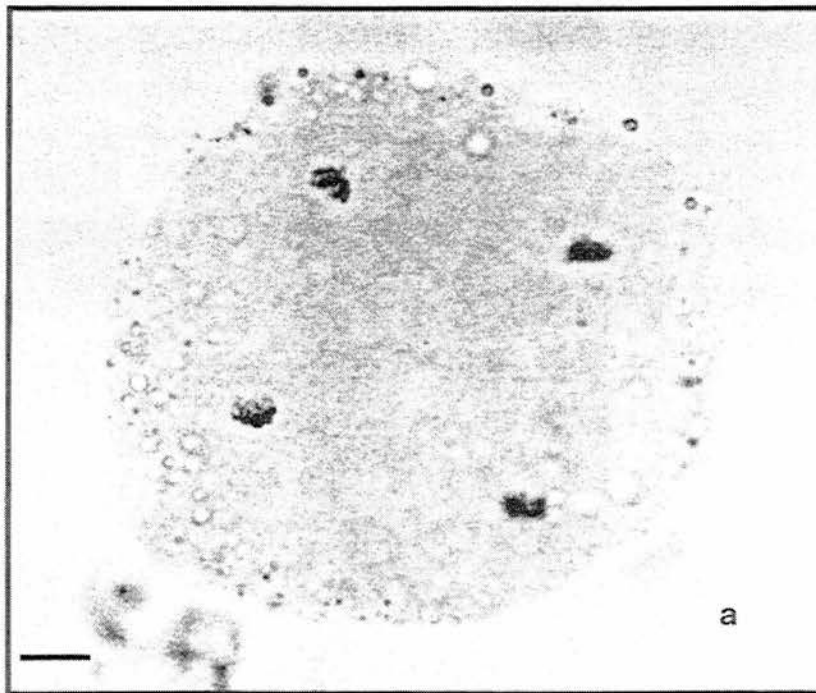


FIGURA 27– *L. l. glabrata* 32/88 (a) telófase II (b) diacinese. (Escala 10 $\mu$ m)

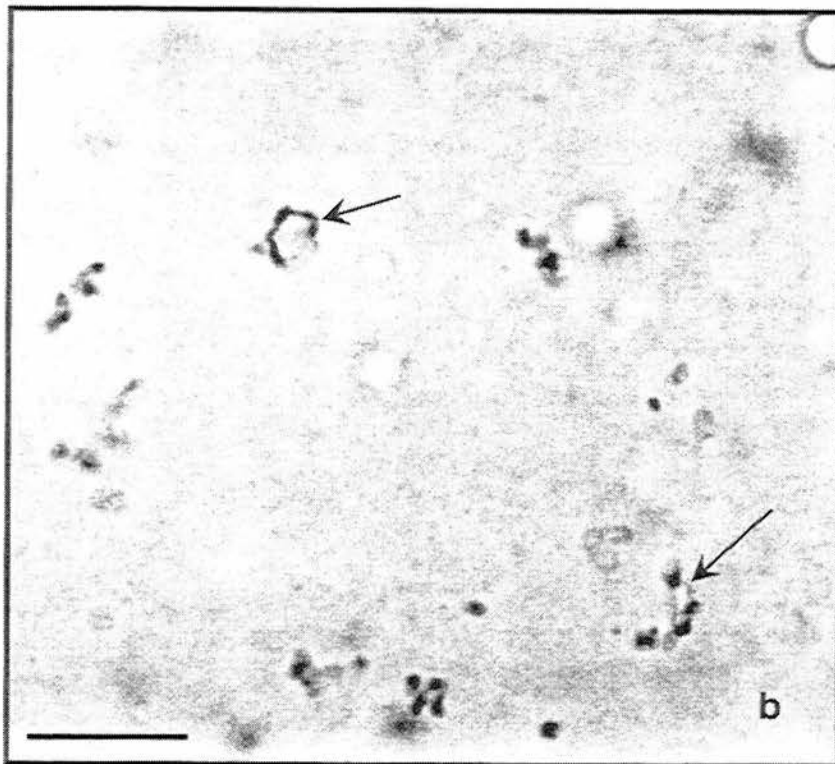
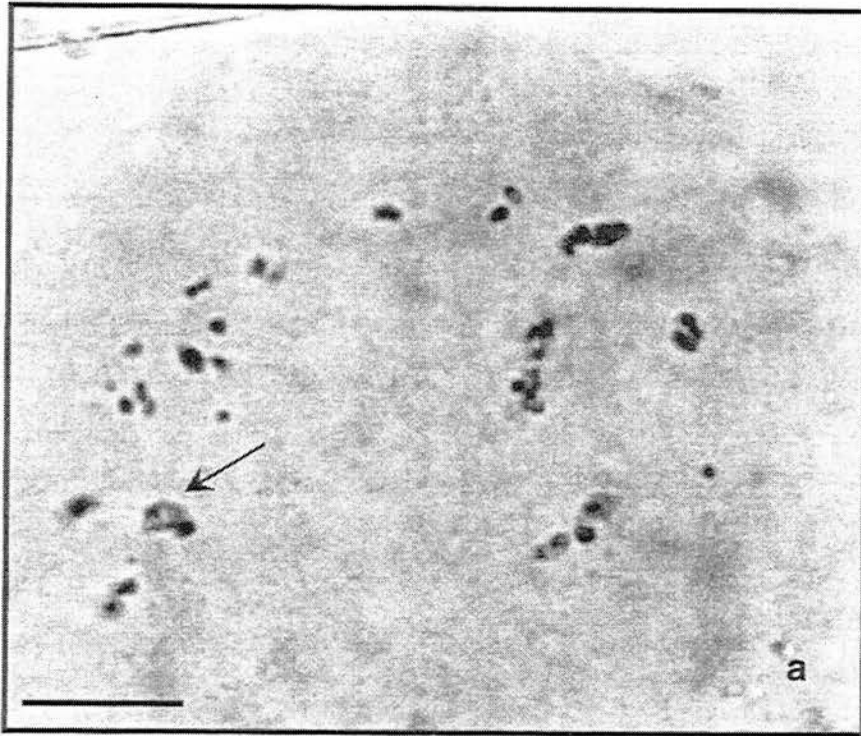


FIGURA 28— Metáfases I de *L. l. glabrata* 32/88, com associações multivalentes (setas). (Escala 10 $\mu$ m)

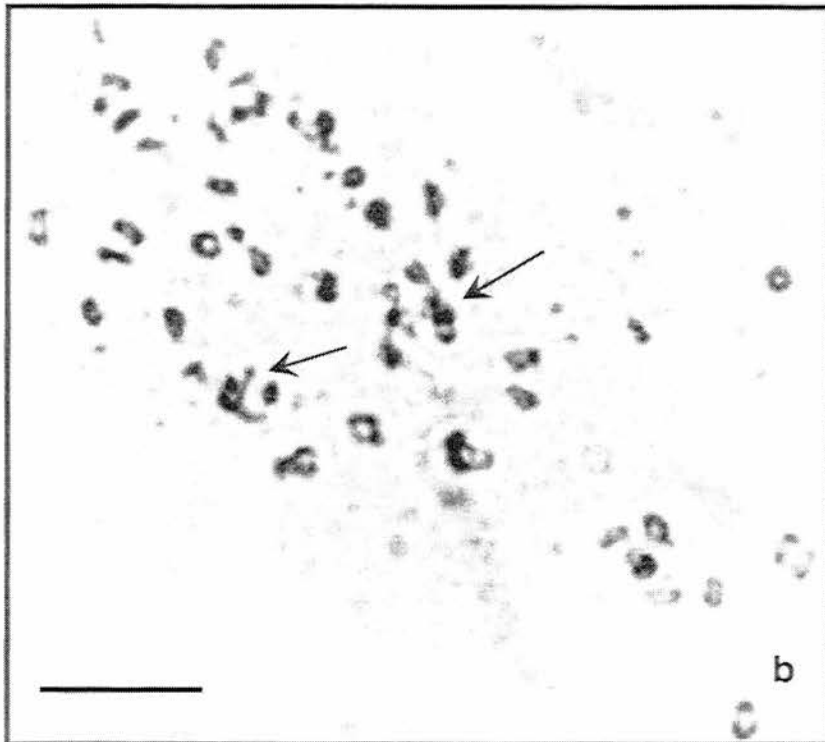
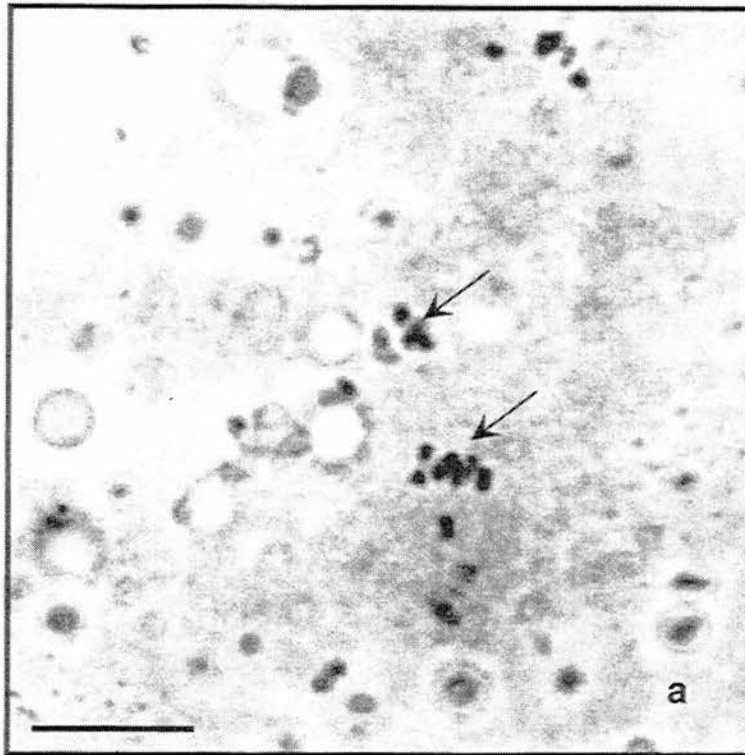


FIGURA 29— Metáfases I de *L. l. glabrata* 19/81 (a) quadrivalentes típicos (setas) (b) várias irregularidades (seta). (Escala 10 $\mu$ m)



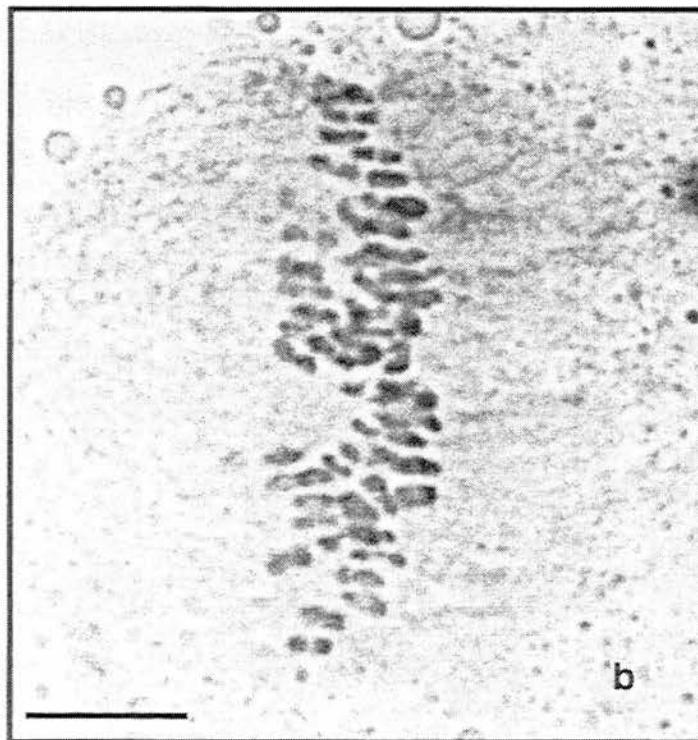
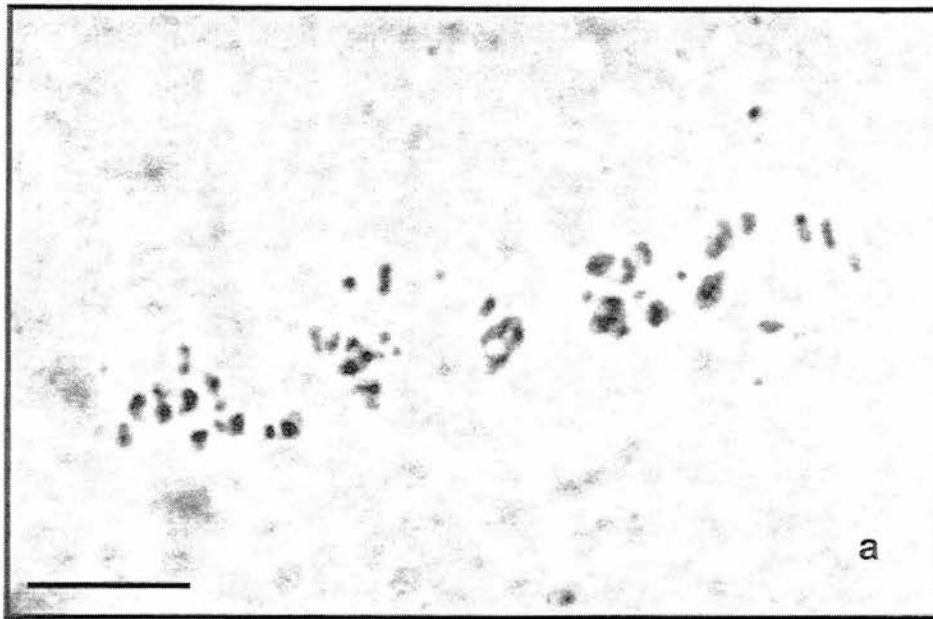


FIGURA 30– Metáfases I de *L. l. glabrata* (a) acesso 19/81 (b) acesso 145/91.  
(Escala 10 $\mu$ m)

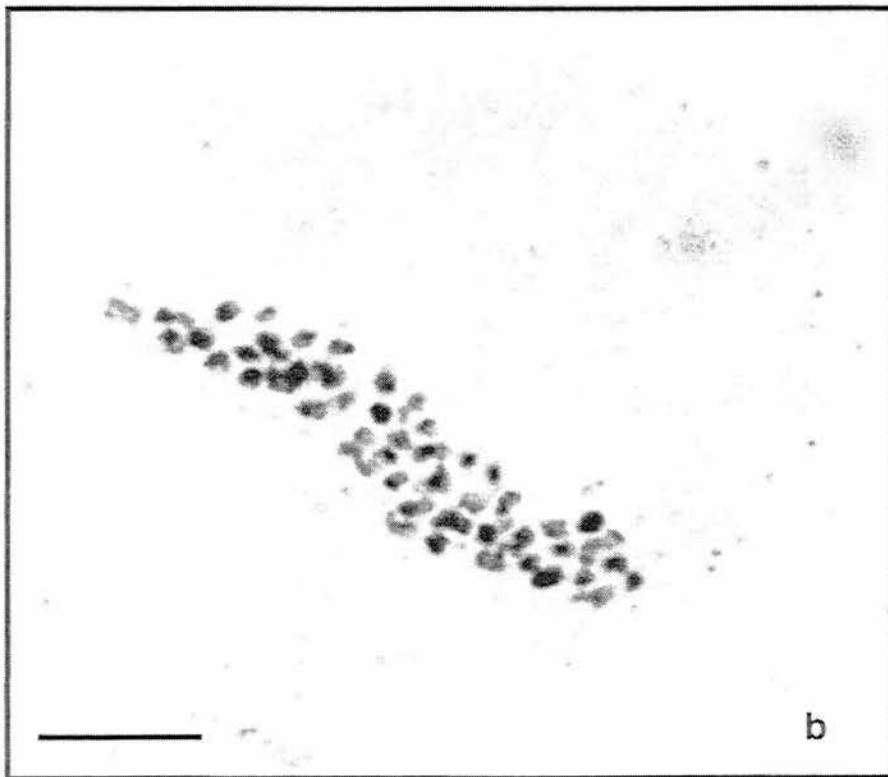
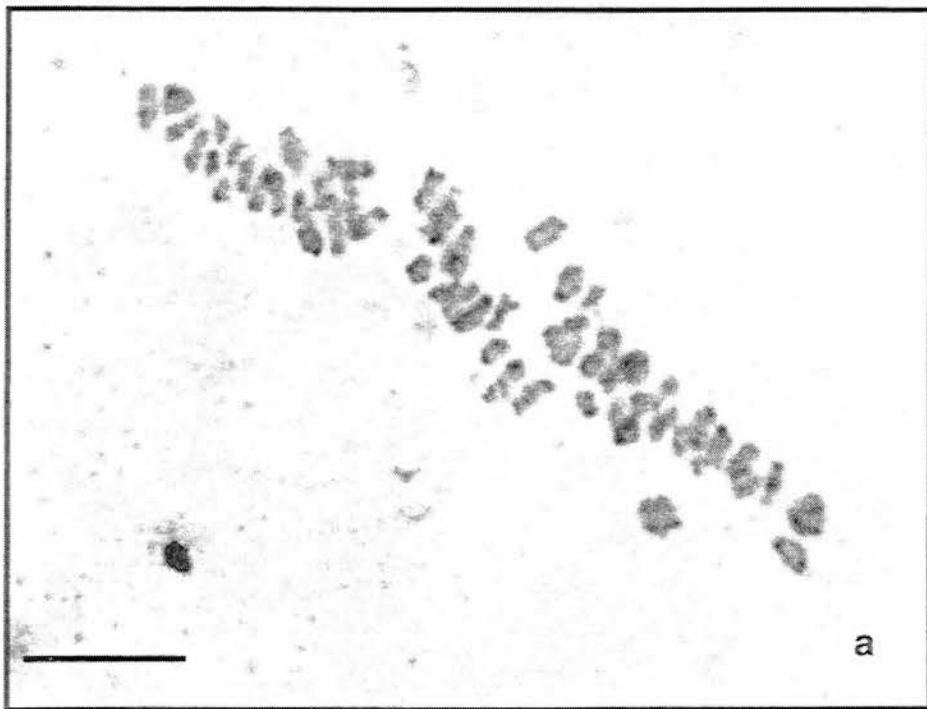


FIGURA 31— Metáfases I regulares de *L. l. glabrata* 92/92. (Escala 10  $\mu\text{m}$ )

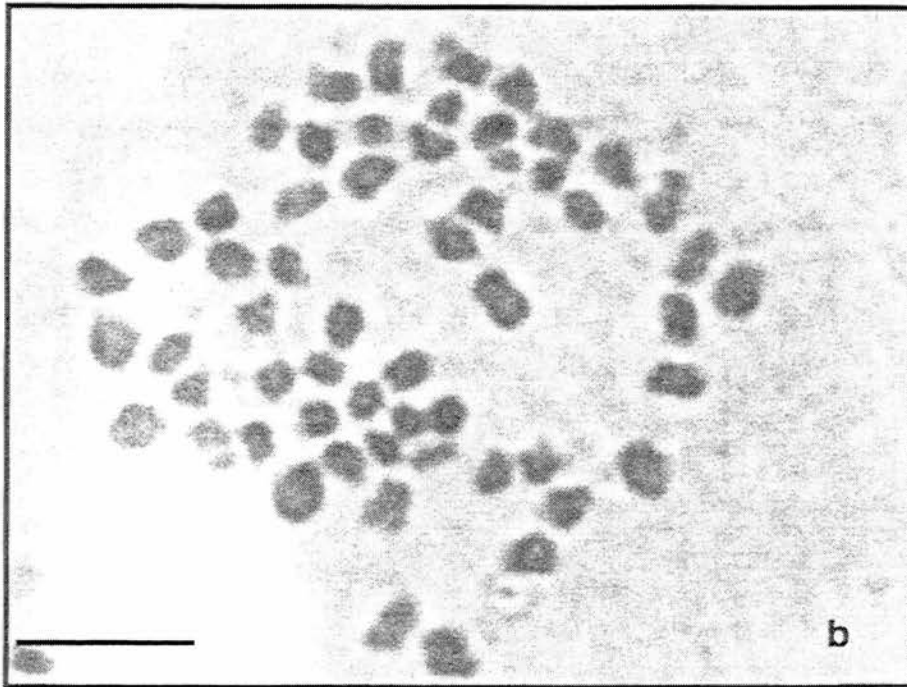
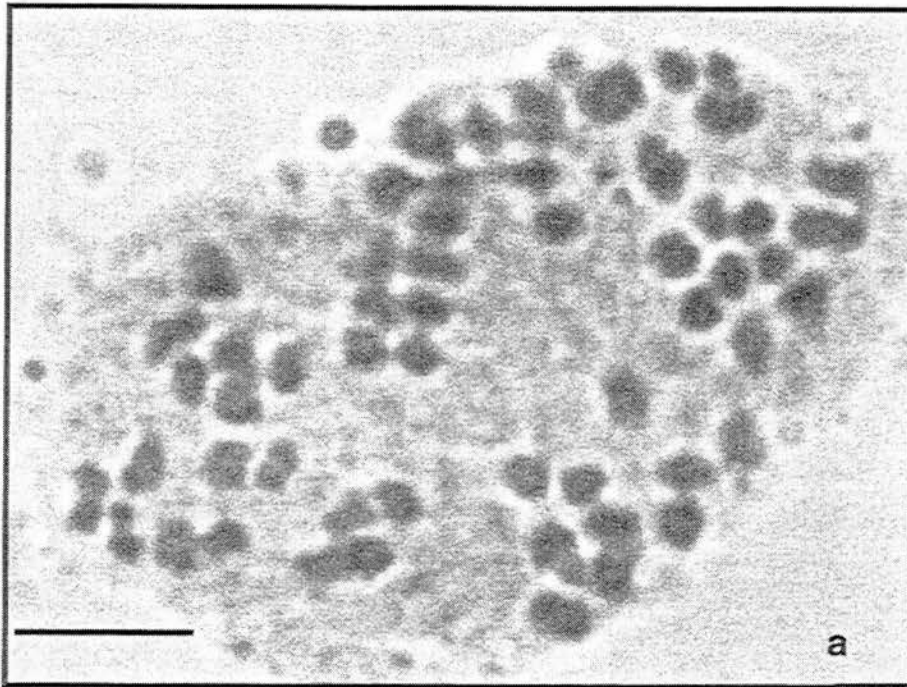


FIGURA 32- Metafases de *L. pallida* 78/92. (Escala 10 $\mu$ m)

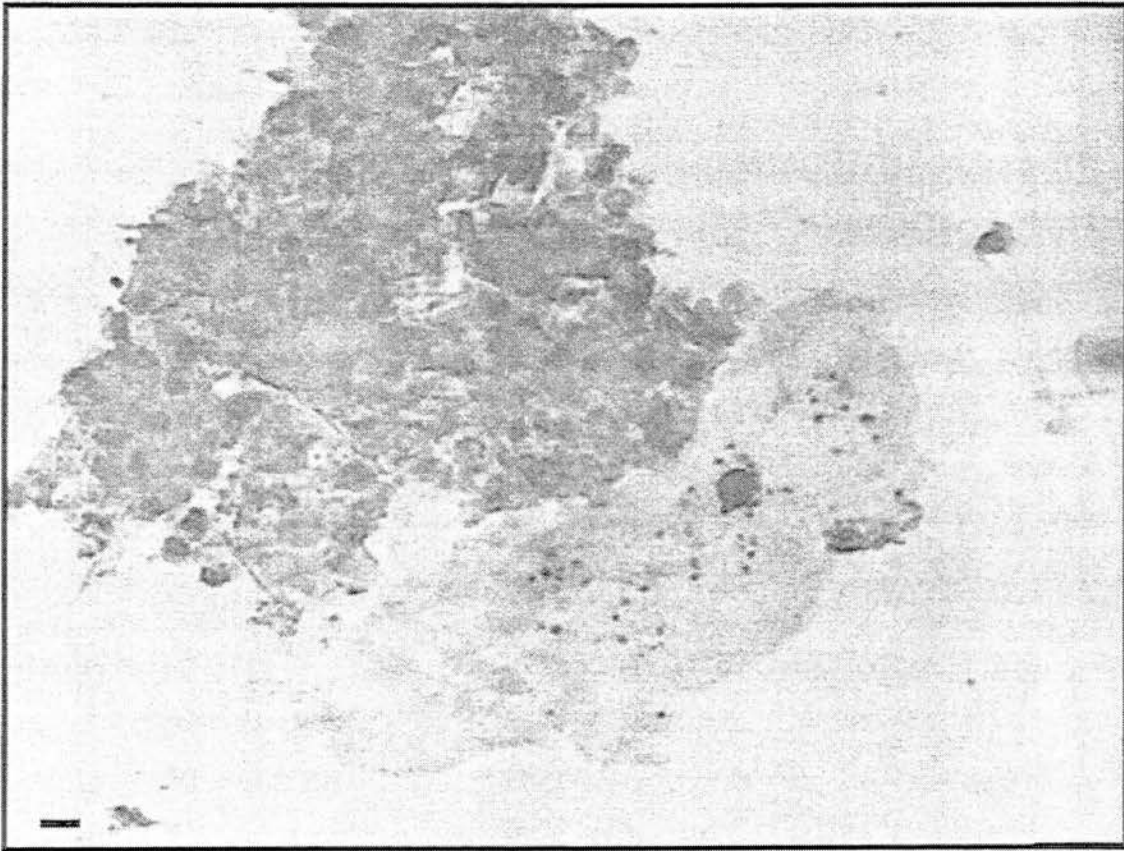


FIGURA 33– Diacinese de *L. pallida* 79/92. (Escala 10 $\mu$ m)

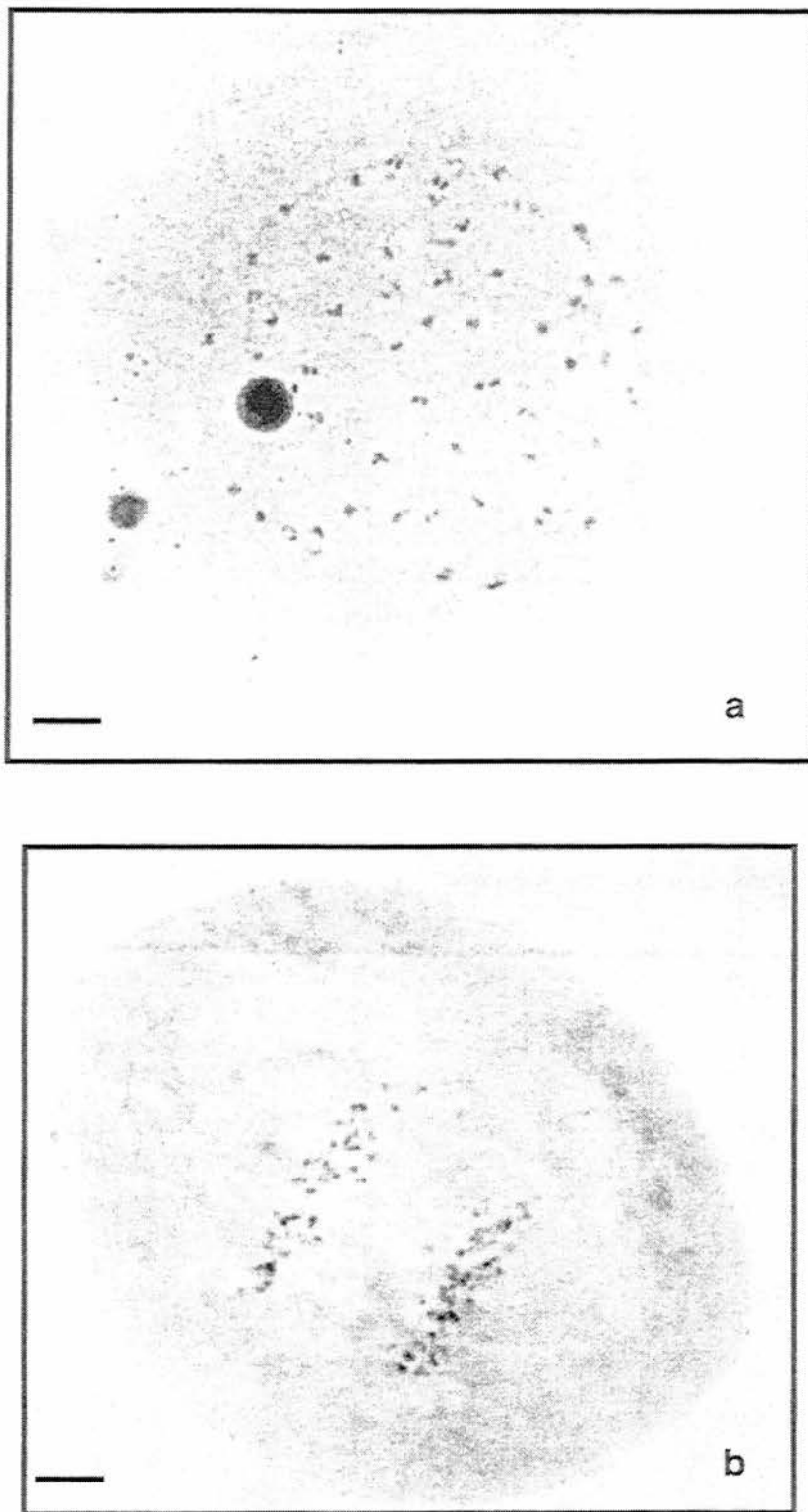


FIGURA 34– *L. x spontanea* 98/94 (a) diacinese (b) anáfase I regular. (Escala 10 $\mu$ m)

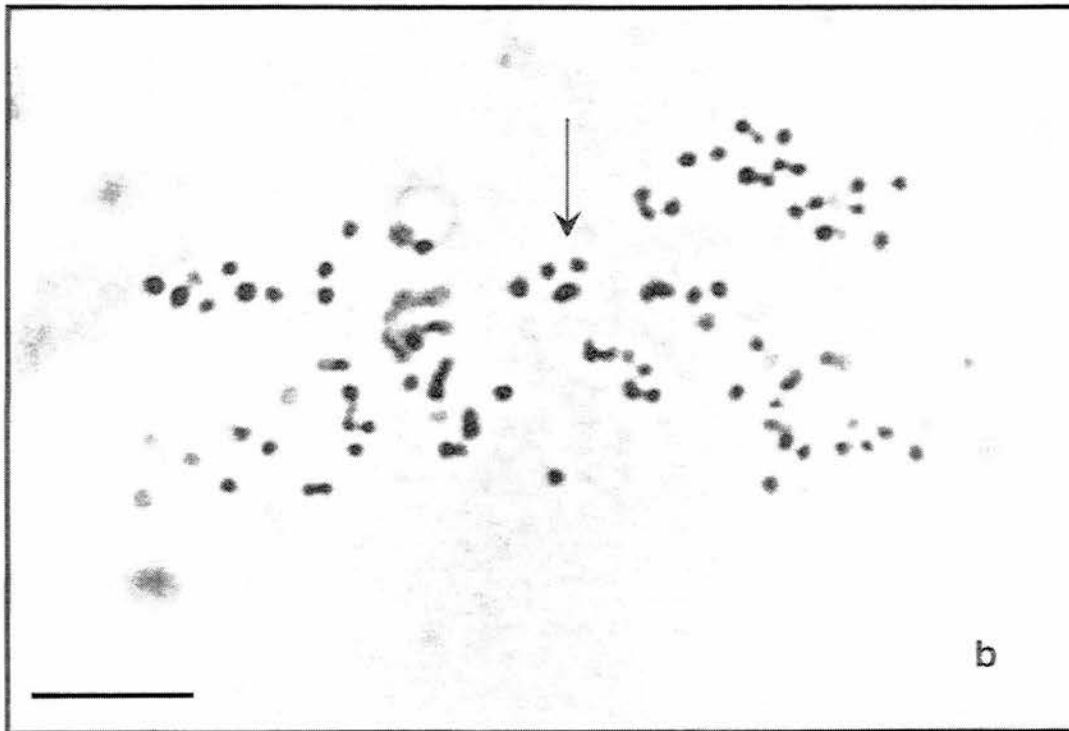
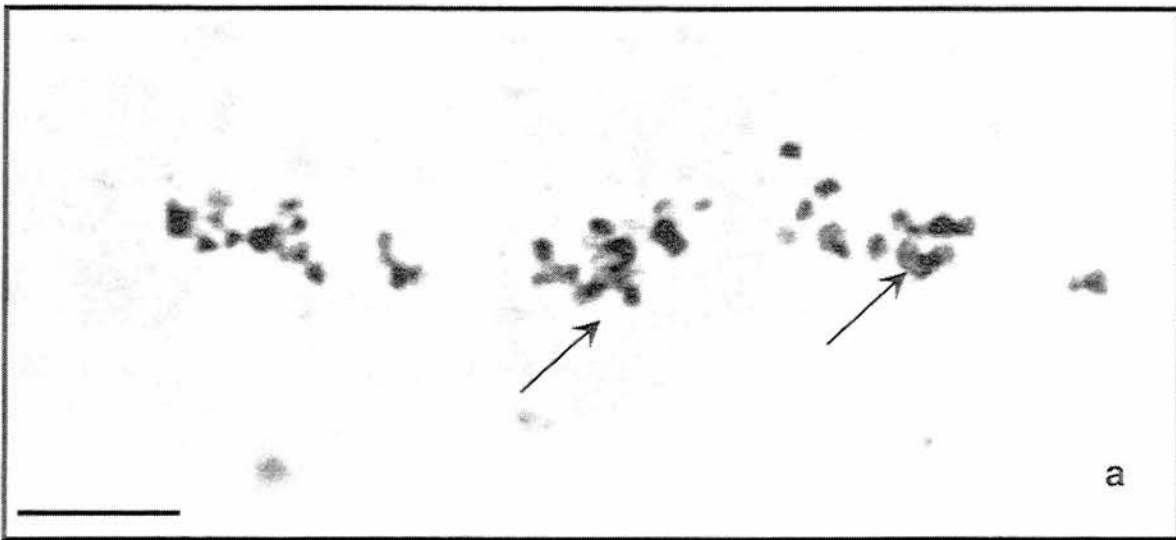


FIGURA 35– Metáfases I de *L. x spontanea* 98/94 irregulares apresentando (a) multivalentes (setas) (b) separação precoce de cromátides (seta). (Escala 10 $\mu$ m)

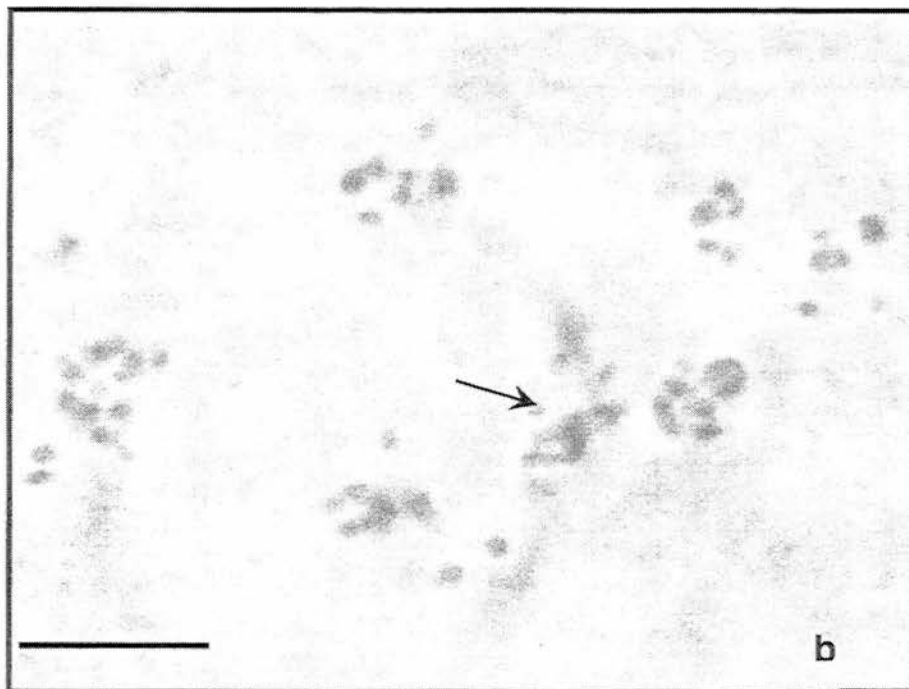
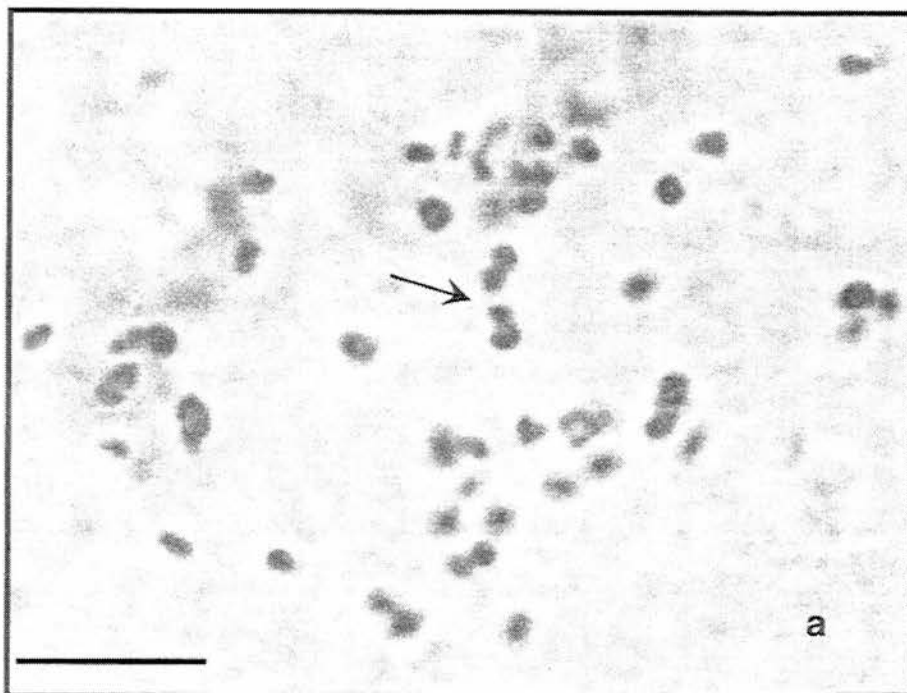


FIGURA 36- Metáfases de *L. ? hybrid* demonstrando algumas associações (setas). (Escala 10 $\mu$ m)

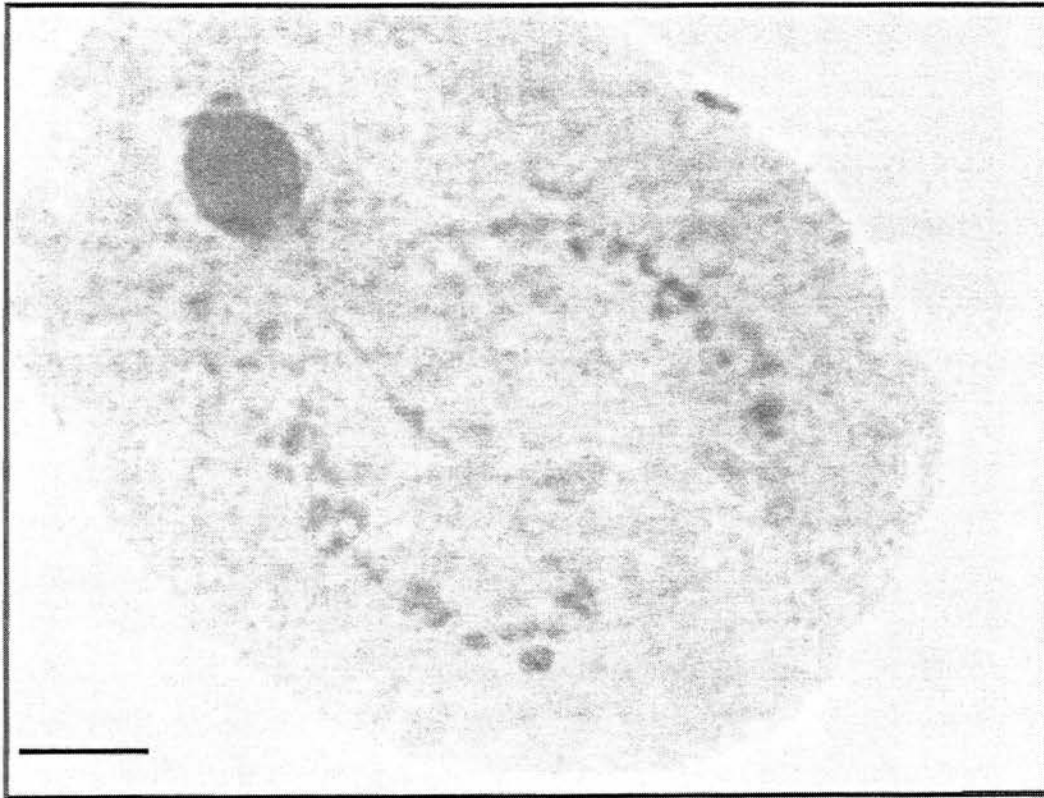


FIGURA 37- Diacinese de *L. ? hybrid* demonstrando possível separação dos genomas. (Escala 10 $\mu$ m)



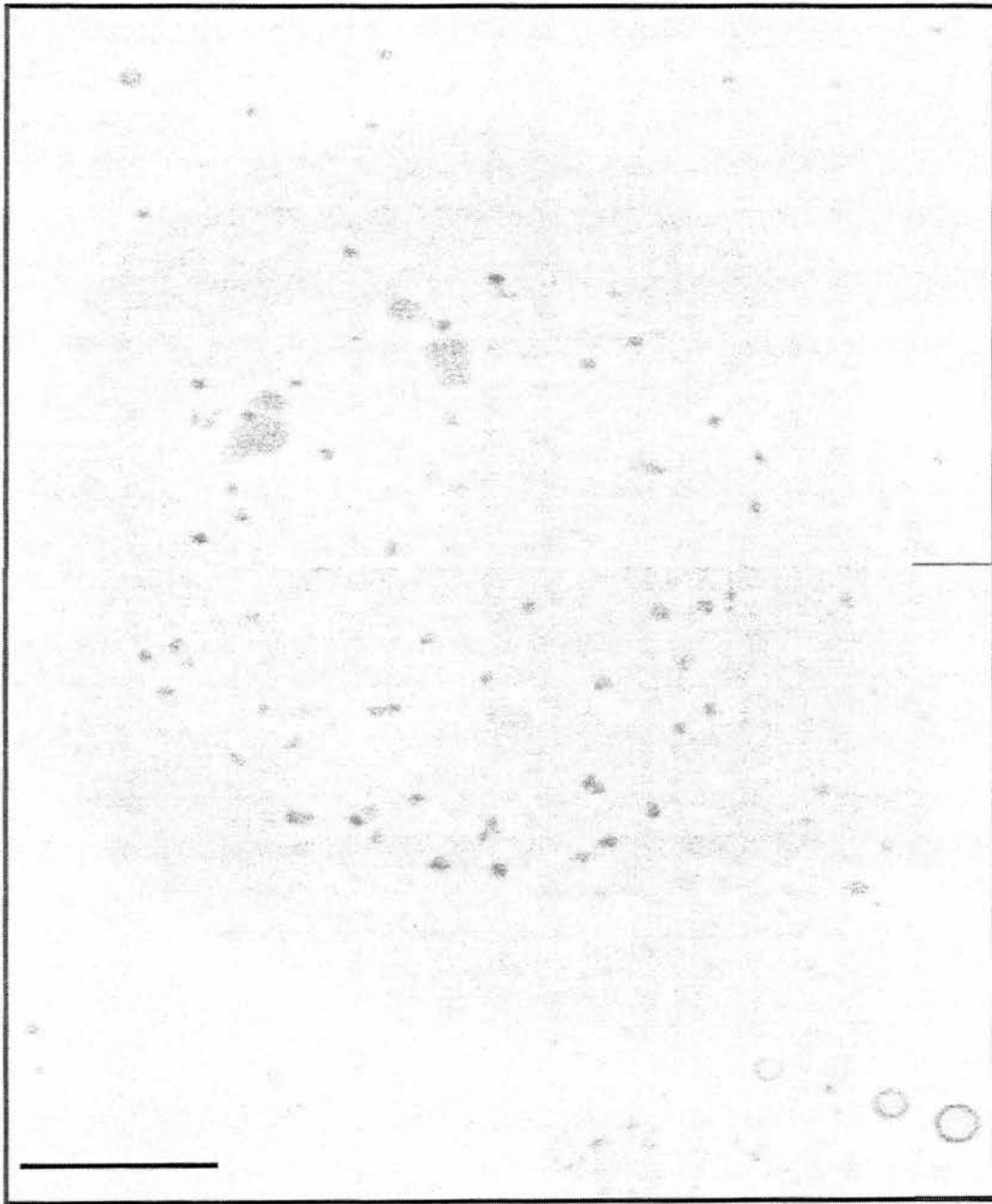


FIGURA 38- Diacinese de *L. ? hybrid* demonstrando a fissão dos nucléolos.  
(Escala 10 $\mu$ m)

#### 4.2. Índice meiótico

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados observados em 193 plantas, de 14 espécies para o estudo de tétrade. O total de células observadas neste estágio foi 77200. De cada planta foram analisadas duas lâminas, sendo contadas aleatoriamente por lâmina, 200 tetrades, totalizando 400 tetrades por indivíduo.

A maioria das plantas mostraram índice meiótico entre 85-98%, apresentando tétrades com quatro micrósporos normais, conforme Figura 39 e 40. Estes resultados se assemelham com os valores encontrados por Freitas *et al.* (1988; 1991) para híbridos artificiais entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, *L. leucocephala* x *L. trichandra*, *L. leucocephala* x *L. esculenta*, *L. leucocephala* x *L. shannonii* e para *L. leucocephala*, *L. diversifolia*, *L. trichandra* e *L. pulverulenta*, para os quais o índice meiótico ficou acima dos 90%.

Na fase de tétrade, a presença de díades e tríades foi observada com frequência entre 0,5 e 10% na maioria dos acessos analisados (Tabela 5, Figura 41). A presença de células com mais de quatro micrócitos também foi observada (Figura 42). Detalhes da análise individual podem ser encontrados no Apêndice 2.

A presença de díades entre os quartetos é um indicativo da formação de gametas não reduzidos. Tríades e outros números são indicativos da formação de gametas com número cromossômico diferenciado e estas são apresentadas como irregularidades (Yan *et al.* 1997).

TABELA 5 – Determinação do índice meiótico em espécies e acessos de *Leucaena*.

Espécies	Acessos	Número de Indivíduos	Índice Meiótico (%)	Limites de Variação	Média de Díade + Tríades (%)
<i>L. confertiflora</i>	87/94	01	93,7	—	3,3
	119/92	01	88,0	—	3,0
<i>L. diversifolia</i>	45/87	03	92,5	88,7↔96,7	6,6
	46/87	04	91,1	89,5↔92,2	7,0
	01/90	05	84,9	77,5↔89,5	10,1
	82/92	02	88,1	88,0↔88,2	7,6
	83/92	05	89,9	88,0↔93,2	7,1
	126/92	02	85,3	84,0↔86,7	9,1
	104/94	02	94,1	87,0↔91,2	4,1
	105/94	04	87,7	81,2↔93,5	6,0
	106/94	03	92,0	90,2↔93,7	5,9
	107/94	03	88,2	87,0↔91,2	8,5
<i>L. involucrata</i>	87/92	02	92,1	94,2↔100	5,3
<i>L. leucocephala glabrata</i>	19/81	03	88,5	85,0↔91,5	6,7
	32/88	07	88,2	83,7↔91,7	7,0
	44/88	04	89,3	88,2↔89,7	6,8
	45/88	07	92,1	88,5↔94,5	5,4
	145/91	06	88,3	83,5↔90,5	7,8
	34/92	03	89,2	87,0↔92,0	6,6
	92/92	07	88,1	84,2↔90,7	7,5
	95/92	03	89,7	87,0↔92,5	6,0
	121/92	04	89,4	88,2↔91,2	6,8
	136/92	05	90,6	89,5↔92,5	6,4
	139/92	02	88,9	86,2↔91,7	7,2
	30/93	06	89,5	87,7↔91,0	6,9
<i>L. leucocephala leucocephala</i>	133/92	09	98,9	95,0↔99,5	1,8
	147/92	02	93,8	97,2↔98,2	1,3
<i>L. pallida</i>	78/92	06	97,8	95,0↔99,5	1,6
	79/92	05	97,5	95,5↔99,7	1,9
<i>L. cuspidata</i>	83/94	01	95,1	—	0,5
<i>L. lanceolata</i>	43/85	03	96,1	91,7↔99,0	3,2
	44/85	01	96,0	—	4,0
<i>L. pulverulenta</i>	83/87	10	98,4	95,7↔100	0,9
	84/87	06	98,5	94,7↔100	0,9
	22/86	03	98,2	97,6↔99,2	1,4
<i>L. retusa</i>	23/86	01	98,7	—	1,3

TABELA 5 – Continuação.

Espécies	Acessos	Número de Indivíduos	Índice Meiótico (%)	Limites de Variação	Média de Díade + Tríades (%)
<i>L. salvadorensis</i>	17/86	01	73,5	—	19,0
<i>L. shannonii</i>	26/84	03	86,5	85,2↔88,5	9,1
	135/92	01	85,0	—	9,7
	141/92	04	93,8	81,2↔96,5	9,4
<i>L. trichandra</i>	35/88	08	95,6	90,5↔99,2	3,7
	53/88	03	93,3	90,7↔95,5	4,3
	03/91	12	95,3	94,2↔97,7	3,8
	128/92	02	98,6	97,7↔99,5	1,4
	131/92	02	96,2	94,7↔97,7	2,4
	137/92	03	91,7	88,7↔93,7	5,5
	138/92	02	97,9	97,7↔98,0	2,2
<i>L. x spontanea</i>	98/94	02	96,6	95,0↔97,7	2,6
<i>L. hybrid ?</i>	52/87	01	65,0	—	20,0



FIGURA 39– Tétrades normais de *L. leucocephala glabrata* 145/91.  
(Escala 10 $\mu$ m)

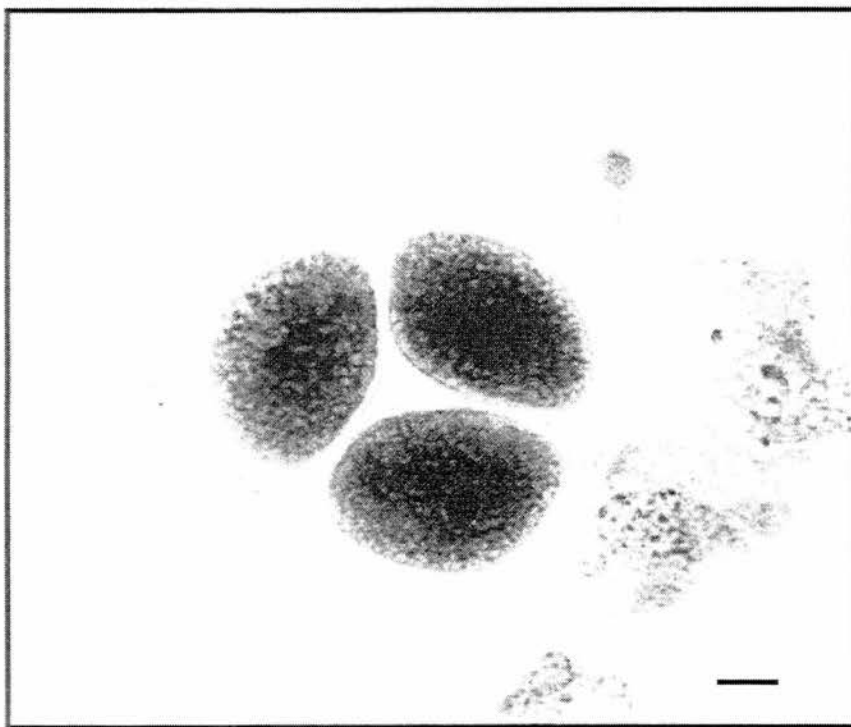


FIGURA 40– Tétrade de *L. lanceolata* 43/85.(Escala 10 $\mu$ m)

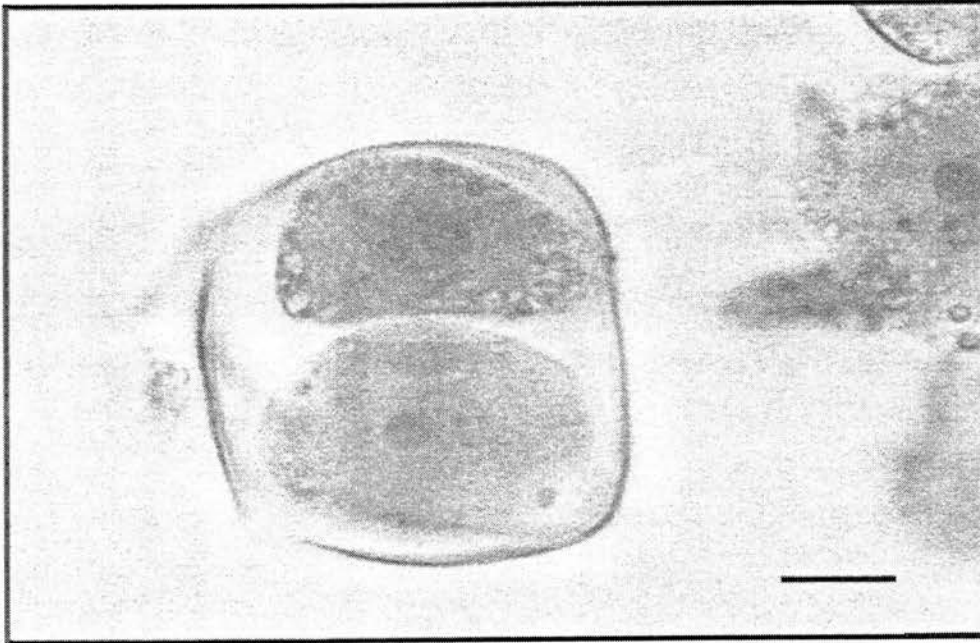


FIGURA 41 – Díade de *L. trichandra* 138/92. (Escala 10 $\mu$ m)

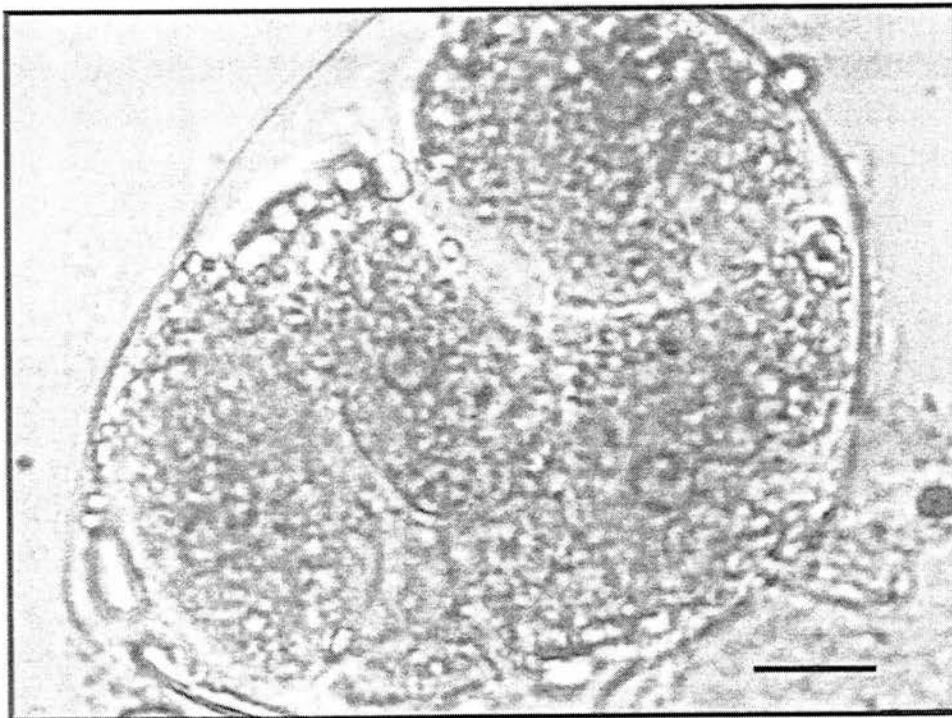


FIGURA 42 – Tétrade com mais de 4 micrósporos em *L. pallida*  
78/92. (Escala 10 $\mu$ m)

Para *L. hybrid 52/87*, foi encontrado o menor índice meiótico da população estudada (65%) provavelmente refletindo as irregularidades meióticas apresentadas.

Os índices meióticos na população estudada foram em geral altos, sendo que 124 plantas das 193 estudadas apresentaram índices superiores a 90%, indicando que estas plantas são meioticamente estáveis (Love, 1949). Em geral, o comportamento meiótico das espécie foi refletido no índice meiótico. E comparando-se espécies diplóides e tetraplóides, observa-se que a maioria das diplóides apresentaram índice meiótico médio superior a 90%.

### 4.3. Grãos de pólen

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos em 14 espécies, 49 acessos e 325 indivíduos, quanto à análise da fertilidade do pólen.

Para esta análise os grãos foram classificados em viáveis, quando completamente corados; parcialmente viáveis, quando apresentavam alguma coloração e inviáveis, quando não havia sinais de corante (Figura 43). O número de grãos de pólen observado para o estudo do pólen da coleção foi de 195000. Detalhes da análise individual são apresentados no Apêndice 3.

Outros tipos de anormalidades observadas, além de grãos não corados, foram pólenes maiores (Figura 44) e pólenes de tamanho menor, que apresentaram-se corados ou não, sendo que a presença de grãos menores não foi devido ao estágio de desenvolvimento das anteras, pois fez-se lâminas com apenas uma antera e verificou-se a presença de pólen menores.

A maioria das plantas analisadas apresentaram valores médios de viabilidade entre 70 e 99%. Estes dados estão de acordo com o encontrado para híbridos artificiais entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, para os quais os valores variaram entre 70 e 97% (Freitas *et al.*, 1991). No entanto, estes resultados diferem um pouco do encontrado por Freitas *et al.* (1988), que verificaram viabilidade do pólen superior a 90% para todos os indivíduos analisados dos cruzamentos entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia*, *L. leucocephala* x *L. esculenta*, *L. leucocephala* x *L. shannonii*, e para as espécies *L. leucocephala*, *L. diversifolia* e *L. pulverulenta*. É provável, que esta diferença tenha ocorrido devido aos diferentes números de indivíduos analisados e



TABELA 6 – Estimativa da fertilidade do pólen em espécies e acessos de *Leucaena*.

Espécies	Acessos	Número de Indivíduos	Média Fertilidade (%)	Limites de Variação	Macropólen Limites de Variação
<i>L. confertiflora</i>	87/94	01	87,0	—	—
	119/92	01	69,0	—	—
<i>L. diversifolia</i>	45/87	05	87,3	70,2↔93,3	—
	46/87	07	71,2	51,3↔80,0	—
	01/90	09	74,8	65,2↔82,8	—
	82/92	04	80,9	73,5↔86,3	0,0 ↔ 0,2
	83/92	12	74,2	57,8↔83,5	—
	126/92	05	61,2	53,2↔74,0	—
	104/94	07	77,1	72,5↔80,8	0,0 ↔ 0,2
	105/94	14	77,6	65,2↔93,3	0,2 ↔ 0,7
	106/94	12	80,4	59,5↔86,0	0,0 ↔ 1,0
107/94	05	54,2	42,3↔63,0	—	
<i>L. involucrata</i>	87/92	04	89,1	86,8↔92,0	—
<i>L. leucocephala glabrata</i>	19/81	05	71,2	50,0↔74,2	—
	32/88	11	79,1	67,3↔89,0	—
	44/88	09	77,4	67,7↔87,5	—
	45/88	13	82,7	77,8↔88,7	—
	145/91	11	82,0	76,7↔87,7	0,0 ↔ 1,3
	34/92	07	76,8	71,2↔81,7	—
	92/92	11	80,4	74,2↔84,3	0,8 ↔ 1,2
	95/92	08	78,7	68,5↔84,7	—
	121/92	07	74,6	43,8↔86,8	—
	136/92	09	85,1	81,2↔88,2	—
	139/92	03	72,2	65,7↔84,3	—
30/93	11	82,9	79,5↔88,0	—	
<i>L. leucocephala leucocephala</i>	133/92	13	91,4	79,8↔99,2	0,0↔ 0,2
	147/92	07	86,2	75,8↔94,7	—
<i>L. pallida</i>	78/92	09	94,1	85,8↔98,2	0,0↔ 1,0
	79/92	12	91,6	84,0↔97,7	—
<i>L. cuspidata</i>	83/94	01	97,8	—	—
<i>L. lanceolata</i>	43/85	03	92,5	87,3↔97,7	0,2 ↔ 0,5
	44/85	02	77,2	58,0↔96,3	0,0 ↔ 1,5
<i>L. pulverulenta</i>	83/87	10	97,9	96,8↔98,7	—
	84/87	10	97,9	96,0↔99,0	0,0↔ 0,2
	22/86	04	93,3	79,2↔98,7	0,0 ↔ 0,5
<i>L. retusa</i>	23/86	01	98,8	—	0,0↔ 0,2

TABELA 6 – Continuação.

Espécies	Acessos	Número de Indivíduos	Média Fertilidade (%)	Limites de Variação	Macropólen Limites de Variação
<i>L. salvadorensis</i>	17/86	02	71,2	57,0↔85,3	—
<i>L. shannonii</i>	26/84	05	85,3	77,8↔88,7	—
	135/92	02	74,1	66,3↔81,8	—
	141/92	07	85,7	78,0↔96,0	—
<i>L. trichandra</i>	35/88	06	92,7	88,8↔97,7	0,8 ↔ 7,0
	53/88	04	82,8	72,8↔90,2	0,0 ↔ 0,2
	03/91	14	90,6	77,3↔96,5	0,2 ↔ 6,3
	128/92	07	84,9	73,6↔98,2	0,0 ↔ 0,2
	131/92	02	91,8	90,8↔92,8	0,0 ↔ 0,2
	137/92	03	82,1	75,3↔89,0	0,0 ↔ 0,6
	138/92	02	93,9	92,7↔95,5	0,0 ↔ 0,8
<i>L. xspontanea</i>	98/94	05	89,5	84,2↔98,2	—
<i>L. ? hybrid</i>	52/87	03	49,1	27,0↔82,7	—

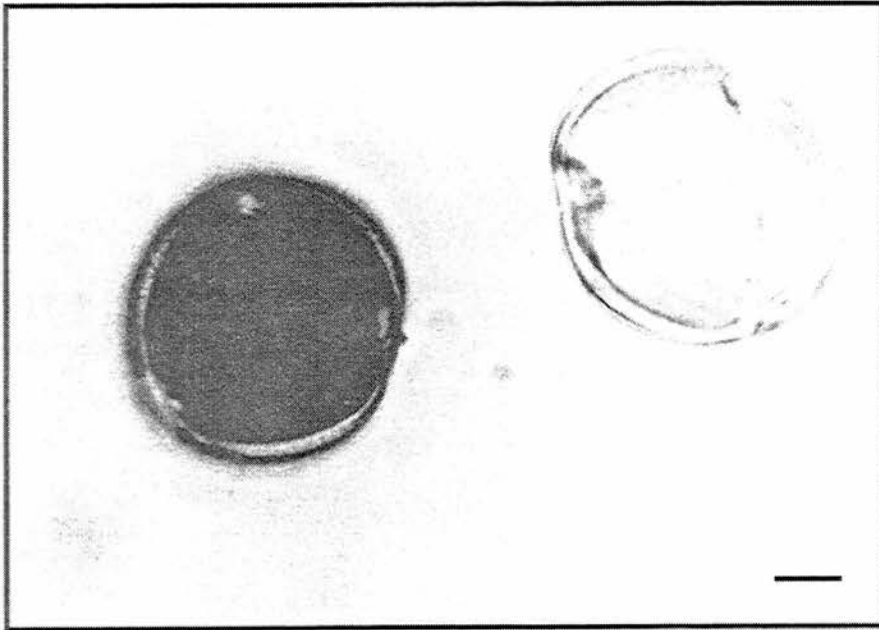


FIGURA 43– Grãos de pólen de *L. l. glabrata* 32/88: viável e inviável. (Escala 10 $\mu$ m)

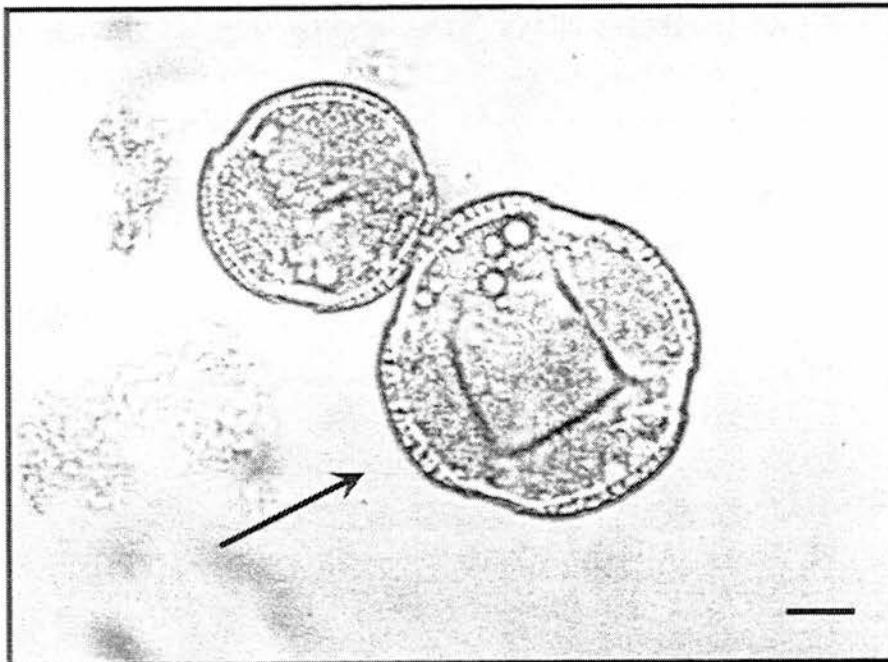


FIGURA 44– Macropólen (seta) de *L. trichandra* 35/88. (Escala 10 $\mu$ m)

porque o material analisado por Freitas *et al.* (1988) já havia sido submetido a um processo de seleção, visando maior produção de forragem e sementes.

Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) analisando a fertilidade do pólen em espécies e acessos diplóides e tetraplóides, encontraram fertilidade acima de 90% para a maioria dos acessos, no entanto, baixos índices de fertilidade foram encontrados em alguns indivíduos de *L. leucocephala glabrata* (1,5 a 68%) e *L. trichandra* (14%).

A percentagem de grãos de pólen viáveis variou bastante entre os acessos de *L. diversifolia*, sendo a frequência máxima de grãos de pólen normais de 87,3% para o acesso 45/87 e frequência mínima de 54,2% para o acesso 107/94. A maior variação entre indivíduos do mesmo acesso foi observada em *L. lanceolata* 44/85; *L. salvadorensis* 17/86; *L. leucocephala glabrata* 121/92, 19/81; *L. diversifolia* 46/87, 83/92, 126/92, 106/94, e *L. hybrid* 52/87.

O baixo percentual de grãos de pólen normais observado em *L. hybrid* (49,1%), reflete as irregularidades apresentadas no comportamento meiótico e também o baixo índice meiótico. Estas irregularidades implicam em problemas na fertilidade do indivíduo, podendo afetar a produção de sementes.

Em *L. diversifolia* 83/92, os dois indivíduos que apresentaram médias de viabilidade mais baixas (Apêndice 3), foram os dois indivíduos coletados após períodos de temperaturas mais baixas (maio de 2000), indicando que possa haver alguma influência de fatores ambientais na formação dos grãos de pólen.

Em *L. leucocephala glabrata* 139/92 dois indivíduos apresentaram grãos de pólen corados, mas com a presença de quatro poros diferenciando-se da morfologia observada na maioria dos grãos (3 poros). Freitas (1990) analisando híbridos entre *L. leucocephala* x *L. diversifolia* observou que a presença de grãos com quatro poros foi comum em vários indivíduos, apresentando-se corados ou não, de tamanho normal ou na forma de macropólen. A presença de grãos de pólen com quatro poros foi verificada em tetraplóides induzidos de *Trifolium riograndense* (Schifino & Moraes Fernandes, 1987).

Em *L. trichandra* 128/92 dois indivíduos apresentaram quantidade reduzida de pólen por lâmina, sendo somados nas três lâminas para cada indivíduo 493 e 534 grãos de pólen.

Os acessos de *L. trichandra* foram os que apresentaram as maiores freqüências de macropólen, em torno de 6 a 7%. Nas outras espécies a freqüência foi relativamente baixa entre 0,2 e 3,5%. Estes dados se assemelham aos encontrados por Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) que registraram freqüência semelhante para um acesso de *L. trichandra* (12%) e verificaram também para a maioria das espécies baixas freqüências (0,0 a 4,5%).

#### **4.4. Análise conjunta da meiose das espécies analisadas de *Leucaena* e considerações sobre implicações evolutivas**

A Tabela 7 apresenta uma síntese dos dados citogenéticos das espécies de *Leucaena* analisadas. Os resultados encontrados para a meiose permitem sugerir sobre a influência da poliploidia na origem destas espécies, principalmente pela freqüente presença de associações quadrivalentes tanto nas espécies diplóides como nas tetraplóides.

Como já referido (ver Revisão Bibliográfica), a poliploidia parece ter um papel importantíssimo na história evolutiva de *Leucaena*. Das 22 espécies atualmente reconhecidas, cinco são poliplóides *L. diversifolia*, *L. leucocephala*, *L. confertiflora*, *L. pallida* e *L. involucrata* (Gonzales *et al.*, 1967; Pan & Brewbaker, 1988; Cardoso *et al.*, 2000; Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b). Para *L. diversifolia*, *L. leucocephala* e *L. pallida* evidências moleculares (Harris *et al.*, 1994a) sugerem uma origem alopoliplóide. Analisando o comportamento meiótico destas espécies, observou-se com freqüência a presença de associações cromossômicas do tipo quadrivalente (Tabela 7).

Segundo Stebbins (1971), a ocorrência de quadrivalentes na meiose pode ser explicada pela heterozigosidade devida a translocações cromossômicas ou podem refletir homologia entre os cromossomos devido a origem poliplóide. Alopoliplóides formariam apenas bivalentes em metáfase I e autopoliplóides naturais teriam alta freqüência de quadrivalentes, enquanto, alopoliplóides segmentares apresentariam comportamento intermediário por terem se originado de diferentes espécies com algum grau de similaridade genética.

Tabela 7 – Síntese comparativa dos dados citogenéticos para as espécies de *Leucaena* analisadas.

Espécie	2n	Meiose		Índice Meiótico Médio (%) <sup>3</sup>	Valor Médio Díades + Triades (%) <sup>3</sup>	Fertilidade do Pólen Média (%) <sup>3</sup>	Macropólens (%)
		Número de Acessos <sup>1</sup>	Associações Cromossômicas <sup>2</sup>				
<i>L. confertiflora</i>	104	1	56II(78,3), A(21,7)	91,0 (2)	3,1 (2)	78,0 (2)	—
<i>L. diversifolia</i>	104	9	52II(91,9), 1-3IV(2,3), 2I(1,4), 2I+1IV(0,8), A(1,7), 1M(1,1)	89,4 (10)	7,2 (10)	73,8 (10)	0,0 ↔ 1,0
<i>L. involucreta</i>	112	1	56II(45,0), A(55,0)	92,1 (1)	5,3 (1)	89,1 (1)	—
<i>L. leucocephala glabrata</i>	104	11	52II(83,0), 1-2IV(11,4), 1III(1,0), 2 a 7I(2,4), 2I+1IV(1,0), M(1,0)	89,3 (12)	6,7 (12)	78,6 (12)	0,8 ↔ 1,3
<i>L. leucocephala leucocephala</i>	104	1	52II(44,7), 2I(5,3), 1IV(7,9), 2I+1IV(2,6), 1M(2,6), >52(36,8)	98,3 (2)	1,5 (2)	88,8 (2)	0,0 ↔ 0,2
<i>L. pallida</i>	112	2	56II(57,1), 1-2IV(36,7), 2I(6,2)	97,7 (2)	1,7 (2)	92,8 (2)	0,0 ↔ 1,0
<i>L. cuspidata</i>	52	—	—	95,1 (1)	0,5 (1)	97,8 (1)	—
<i>L. lanceolata</i>	52	—	—	96,0 (2)	3,6 (2)	84,8 (2)	0,0 ↔ 1,5
<i>L. macrophylla</i>	56	1	28II(2,4), 1-2IV(4,8), 2I(9,5), A(14,3), M(4,8), IR(64,3)	—	—	—	—
<i>L. pulverulenta</i>	56	3	28II(83,6), 1-2IV(15,7), 2I(0,7)	98,4 (3)	1,1 (3)	96,4 (3)	0,2 ↔ 0,5

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências. Entre parênteses, percentagem de células.

<sup>3</sup> Número de acessos entre parênteses.

<sup>4</sup> Variação entre os valores médios encontrados entre todos os acessos.

TABELA 7 – Continuação.

Espécie	2n	Meiose		Índice Meiótico Médio (%) <sup>3</sup>	Valor Médio Diades + Triades (%) <sup>3</sup>	Fertilidade do Pólen Média (%) <sup>3</sup>	Macropólens <sup>4</sup> (%)
		Número de Acessos <sup>1</sup>	Associações Cromossômicas <sup>2</sup>				
<i>L. retusa</i>	52	1	26II(60,7), 2I(7,1), 1-3IV(28,6), 1M(3,6)	98,7 (1)	1,3	98,8 (1)	0,0 ↔ 0,2
<i>L. salvadorensis</i>		1	±50II(37,5), 1-2IV(62,5)	73,5 (1)	19,0	71,2 (2)	—
<i>L. shannonii</i>	52	2	26II(42,4), 1-2IV(10,2), A(32,2), 1M(1,7), 2I(1,7), IR(11,9)	86,7 (2)	9,2	85,3 (5)	—
	56	1	28II(40,0), 2I(10,0), 1III(6,7), A(43,3)	85,0 (1)	9,7	74,1(2)	—
<i>L. trichandra</i>	52	7	26II(92,7), 1 a 2IV(5,6), 2I(1,1), M(0,6)	95,5 (7)	3,3	92,7 (6)	0,0 ↔ 7,0
<i>L. x spontanea</i>	104	1	52II(48,9), 1-4I(12,2), 1-2IV(22,4), 1M(16,3)	96,6 (1)	2,6	89,5 (5)	—
<i>L. ? hybrid</i>	112	1	IR (100)	65,0 (1)	20,0	49,1 (3)	—

<sup>1</sup> Coleção de sementes do Oxford Forestry Institute

<sup>2</sup> Associações cromossômicas em diacinese e metáfase I; I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas não interpretadas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências. Entre parêntese, percentagem de células.

<sup>3</sup> Número de acessos entre parênteses.

<sup>4</sup> Variação entre os valores médios encontrados entre todos os acessos.



Entretanto, a “diploidização” cromossômica, ou seja, a regularização do pareamento apenas em bivalentes (Stebbins, 1971) é conhecida em espécies de origem autopoliplóide como a alfafa e em alopoliplóides “segmentares” como o trigo, onde o gene Ph impede a formação de multivalentes entre os cromossomos homeólogos (Riley & Chapman, 1958).

Da mesma forma, dados moleculares sugerem que após o evento de poliploidização várias e rápidas mudanças ocorram no genoma induzindo uma “diploidização” gênica, incluindo ação de transposons e silenciamento gênico, facilitando a rápida evolução dos poliplóides (Soltis & Soltis, 1999). Atualmente sugere-se que muitas espécies consideradas diplóides são, na realidade, poliplóides antigos, sendo o exemplo clássico o milho (Leitch & Bennett, 1997).

A presença de quadrivalentes nas espécies tetraplóides de *Leucaena* pode ser explicada, no caso de *L. pallida*, *L. diversifolia* e *L. leucocephala*, pela sua origem alopoliplóide segmentar, ou seja, pela presença de similaridade genética entre as espécies progenitoras haveria algum grau de pareamento intergenômico levando a formação de quadrivalentes. Para *L. confertiflora* e *L. involucrata*, apesar de não haver nenhuma hipótese prévia baseada em morfologia ou DNA, citologicamente a presença de associações múltiplas também pode ser explicada pela origem alopoliplóide segmentar. A existência de uma variação intraespecífica e intrapopulacional nestas duas espécies, quanto ao número cromossômico, sugerem um complexo processo evolutivo, envolvendo múltiplas origens (Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b)

Para *L. x spontanea*, um híbrido natural entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia*, a maioria dos indivíduos analisados apresentaram frequências variáveis de quadrivalentes, trivalentes, univalentes e multivalentes, mas sempre maior frequência de bivalentes. Este mesmo comportamento foi encontrado por Freitas *et al.* (1988; 1991) para híbridos artificiais entre estas duas mesmas espécies, que sugeriu a existência de um controle do pareamento meiótico, com formação preferencial de bivalentes.

Singh (1993) comentou que o pareamento em II está sob controle genético, conseqüentemente a regularidade da meiose é dependente deste controle. De Wet e Harlan (1972) sugerem que o pareamento cromossômico em poliplóides está dependente não só da homologia entre os cromossomos, mas também da presença de determinados genes. Este mecanismo de controle do pareamento já foi descrito para muitos organismos, sendo um exemplo clássico o trigo (Riley & Chapman, 1958). No caso de *L. x spontanea* é mais provável que as associações múltiplas encontradas sejam resultado de um pareamento intergenômico por homeologia.

O acesso *L. ? hybrid* apresentou comportamento meiótico altamente irregular, refletido no baixo índice meiótico e na baixa fertilidade do pólen (Tabela 7). Segundo Harris *et al.* (1994a) dados moleculares de cpDNA sugerem origem híbrida para este acesso, no entanto, não existem informações conclusivas sobre os possíveis progenitores (Hughes, 1998b). Os dados de comportamento meiótico sugerem que possa ter surgido da união de espécies com genomas bastante distintos, levando ao grande número de irregularidades,

como I, III, IV e outros multivalentes, além de separação precoce dos cromossomos e cromátides.

No caso das espécies diplóides, a presença de associações quadrivalentes, em frequências variáveis, na maioria dos acessos analisados (Tabela 7) assim como o alto número básico com relação às outras espécies da Subfamília Mimosoideae (Goldblatt, 1981) apóia a idéia de origem paleopoliplóide destes taxa (Stebins, 1971).

Comparando-se na Tabela 7 o comportamento meiótico, os valores encontrados para índice meiótico e fertilidade dos grãos de pólen, verifica-se que os dados estão coerentes. Em geral, acessos que apresentaram comportamento meiótico regular obtiveram índices meióticos e fertilidade do pólen satisfatórios, apesar de não haver uma relação direta.

Moraes Fernandes (1982), em estudos com cultivares de trigo, afirmou que o índice meiótico é um bom critério para selecionar plantas meioticamente estáveis. Afirmou ainda, que pela rapidez de avaliação, fornece ao melhorista um indicador valioso da estabilidade genética de uma cultivar e evidencia que o comportamento meiótico é certamente um fator necessário para que a transmissão regular das características agrônômicas desejáveis de uma planta sejam mantidas. Tal relação entre índice meiótico e regularidade meiótica foi verificada nos acessos das diferentes espécies estudadas.

De maneira geral, a fertilidade do pólen pode ser considerada média-alta (70 a 90%), sendo que quando foram muito baixas havia correlação com irregularidades meióticas, como é o caso de *L. ? hybrid* (Tabela 7). Ainda

quanto aos estudos realizados com pólen, pode-se verificar a presença elevada de macropólen em acessos de *L. trichandra* (Tabela 7).

Macropólen, assim como díades e tríades, seriam indicativos de gametas não reduzidos (GNR), em *Leucaena* e em outras espécies. Sorensson & Brewbaker (1987) realizaram o primeiro estudo objetivando verificar a frequência de GNR em espécies diplóides e tetraplóides de *Leucaena*. Os autores encontraram uma frequência muito baixa, entre 0,0 e 0,7% as espécies, sendo exceção o valor de 8,7% encontrado para *L. trichandra*.

Schifino-Wittmann *et al.* (1997) e Schifino-Wittmann & Simioni (1998) investigando a ocorrência GNR na microesporogênese em híbridos artificiais entre *L. leucocephala* e *L. diversifolia*, relataram a ocorrência de (GNR) acima de 29,8% para estes híbridos.

Schifino-Wittmann & Simioni (1999) e Schifino-Wittmann *et al.* (2000b) encontraram altas frequências de gametas não-reduzidos em *Leucaena*: 12% em *L. trichandra* (03/91), 7,5% em *L. pulverulenta* (84/87) e 7,0% em *L. leucocephala* (139/92), além de baixas frequências em outras espécies.

As investigações agora realizadas confirmam que *L. trichandra* é espécie de *Leucaena* com maior produção de gametas não reduzidos entre as estudadas, o que é importante pelo fato desta espécie ser uma das diplóides favoritas a programas de melhoramento. A observação de indivíduos poliploides em um acesso de *L. trichandra* (Schifino-Wittmann *et al.*, 2000b) sugere que a ocorrência de gametas  $2n$  e a autopoliploidização espontânea poderiam ainda estar atuando, ao menos nesta espécie.

A existência de gametas não reduzidos em *Leucaena* sugerem que estes possam ser utilizados para transferir genes de importância, como os de tolerância a acidez do solo de espécies diplóides para espécies tetraplóides (Sorensson, 1997). Além disto, os gametas  $2n$  em espécies diplóides apóiam a possibilidade de sua utilização no melhoramento de *Leucaena* através de poliploidização sexual e como uma ponte entre diferentes níveis de ploidia (Schifino-Wittmann *et al.* 2000b).

De maneira geral, os dados apresentados indicam que a maioria das espécies de *Leucaena* apresentam comportamento meiótico regular, culminando com sucesso na formação de grãos de pólen. Os dados também apóiam que as espécies tetraplóides sejam, muito provavelmente, alopoliplóides segmentares, e que as espécies diplóides de *Leucaena* sejam paleopoliplóides. Entretanto, a ocorrência de autopoliploidia com posterior diploidização não pode ser totalmente descartada em todas as espécies do gênero.

Para melhor compreender a história evolutiva de *Leucaena*, no que diz respeito aos possíveis progenitores das espécies diplóides, e as origens e relações de parentesco entre as espécies tetraplóides sugere-se a ampliação dos estudos e o emprego de técnicas mais avançadas de citogenética. GISH (Genomic *in situ* Hybridization) seria uma ferramenta importantíssima no estudo das relações evolutivas das espécies de *Leucaena*.

⇒ Cabe salientar, que os dados apresentados mostram como técnicas de citogenética clássica, relativamente simples quando comparadas a técnicas moleculares, quando realizadas cuidadosa e detalhadamente e em vários

acessos por espécie, podem fornecer informações de extrema importância para estudos evolutivos, bem como informações básicas para futuros trabalhos de melhoramento.

## CONCLUSÕES

1. As espécies de *Leucaena* analisadas, de maneira geral, apresentaram comportamento meiótico regular, com preferencial formação de bivalentes. A frequência de multivalentes (quadrivalentes) tanto nas espécies diplóides como nas tetraplóides, é maior que a esperada, permitindo inferir sobre as possíveis origens das espécies.
2. A regularidade meiótica foi refletida no índice meiótico (acima de 80%) e fertilidade dos grãos de pólen (entre 71 e 98%), que indicam bons níveis de fertilidade das espécies submetidas às condições do Rio Grande do Sul. A presença de díades, tríades e macropólens indicam que a ocorrência de gametas não reduzidos é comum em *Leucaena*.
3. A citogenética clássica, quando utilizada adequada e cuidadosamente, pode fornecer dados importantes para estudos taxonômicos, evolutivos e no melhoramento de plantas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, M. D. O development and use old genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: KEW CHROMOSOME CONFERENCE, 4, Kew, 1995. **Proceeding...** Kew: Royal Botanic Gardens, 1995. p.167-183.
- BENNETT, S.T.; KENTON, A.Y.; BENNETT, M.D. Genomic *in situ* hybridizations reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). **Chromosoma**, Berlin, v.101, p. 420-424, 1992.
- BORZAN, Z.; ZOLDOS, V.; KRSTINIC, A. *et al* Ploidy of some arborescent willow clones in relation to their production in field tests. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E. (Eds.) **Cytogenetics of forest trees and shrub species**. Zagreb: Croatian Forests, 1997 p. 295-302.
- BREWBAKER, J.L. Species in the genus *Leucaena*. **Leucaena Research Report**, Taiwan, n. 7, p. 6-20, 1987a.
- BREWBAKER, J.L. *Leucaena*: a multipurpose tree genus for tropical agroforestry. In: STEPLER, H. A.; NAIR, P.K. (Eds.). **Agroforestry: a decade of development**. Nairobi: International Council for Research in Agroforestry, 1987b. p. 289-323.
- BREWBAKER, J.L. Cloning of seedless *Leucaenas* for plantation use. **Leucaena Research Report**, Taiwan, n. 9, p. 111-112, 1988.
- BREWBAKER, J.L.; SORENSSON, C.T. Domestication of lesser know species in the genus *Leucaena*. In: LEAKEY, R.; NEWTON, A. (Eds.) **Tropical Trees: the Potencial for Domestication**. Edinburg: Institute of Terrestrial Ecology, 1994. p. 195-204.
- BRITTON, N.L.; ROSE, J.N. Mimosaceae. **North American Flora**, [S.I.], n. 23, p. 121-131, 1928.
- BUTORINA, A.K.; KOSICHENKO; ISAKOV, Y.N. *et al*. The effects of irradiation from the Chernobyl nuclear power plant accidente on the citogenetic behavior and anatomy of trees. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E. **Cytogenetics of forest trees and shrub species**. Zagreb: Croatian Forests, 1997. p. 211-226.



- CARDOSO, M.B.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; BODANESE-ZANETINI, M.H. Taxonomic and evolutionary implications of intraespecific variability in chromosome numbers of species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae). **Botanical Journal of the Linnean Society of London**, London, v.134, p. 549-556. 2000.
- CAVALCANTE, H.C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DORNELLES, A.L.C. Meiotic behavior and pollen fertility in an open-pollinated population of "Lee" mandarin (*Citrus clementina* x (*C. paradisi* x *C. tangerina*)). **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 86, p. 103-114, 2000.
- DE WET, J.M.; HARLAN, J.R. Chromosome pairing and philogenetic affinities. **Taxon**, Utrecht, v. 21, n. 1, p. 67-70, 1972.
- FREITAS, L.H.C. **Caracterização morfológica e análise citogenética de híbridos entre *Leucaena leucocephala* (2n=104) e *L. diversifolia* (2n=104)**. 1990. 142f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- FREITAS, L.H.C. **Caracterização morfológica e eletroforética de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia***. 1999. 200f. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- FREITAS, L.H.C., SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; HUTTON, E.M. Cytogenetic analysis of species and hybrids between of *Leucaena* (Leguminosae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 97-109, 1988.
- FREITAS, L.H.C.; PAIM, N.R.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Floral characteristics, chromosome number and meiotic behavior of hybrids between *L. leucocephala* (2n=104) and tetraploid *L. diversifolia* (2n=104) (Leguminosae). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, n.2, p.781-789, 1991.
- FREITAS, L.H.C.; PAIM, N.R.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Caracterização morfológica de híbridos de *Leucaena leucocephala* and *Leucaena diversifolia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.1, p.61-68, 1995.
- GOLDBLATT, P. Cytology and the phylogeny of leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.(Eds.) **Advances in Legume Systematics**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1981. Part 2, p. 427-463.
- GONZALES, V.; BREWBAKER, J.L.; HAMILL, D.E. *Leucaena* cytogenetics in relations to the breeding of low mimosime lines. **Crop Science**, Madison, v. 7, p. 140-141, 1967.

- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.
- HANNA, H.H. Application of cytogenetics to plant breeding. **Proceedings of southern pasture and forage crop improvement conference**, [S.I.], p. 75-80, 1980.
- HARLAN, J.R.; DE WET, J.M.J. On *Ö* Winge and a prayer: the origins of polyploidy. **The Botanical Review**, New York, v.41, n.4, p. 311-390, 1975.
- HARRIS, S.A. Systematic and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* (Leguminosae: Mimosoideae). **Plant Systematics and Evolution**, Austria, n. 197, p.195-208, 1995.
- HARRIS, S.A.; HUGHES, C.E.; ABBOTT, R.J.; INGRAM, R. A phylogenetic analysis of *Leucaena* (Leguminosae: Mimosoideae). **Plant Systematics and Evolution**, Austria, v. 91, p.1-26, 1994a.
- HARRIS, S.A.; HUGHES, C.E.; ABBOTT, R.J.; INGRAM, R. Genetic variation in *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. (Leguminosae: Mimosoideae). **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 43, p.159-167, 1994b.
- HARRIS, S.A.; CHAMBERLAIN, J.R.; HUGHES, C.E. New insights in to the evolution of *Leucaena* Benth. In: PICKERSGILL, B.; LOCK, J.M. (Eds.). **Advances in legume systematics 8: Legumes of economic importance**. Edinburg, Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. v.7, p.117-126.
- HARTMAN, T.P.V.; JONES, J.; BLACKHALL, N.W. *et al.* Cytogenetics, molecular cytogenetics and genome size in *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae). In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.) **Cytogenetics studies of forest trees and shrubs: review, present status, an outlook on the future**. Zioven, Slovakia: Arbora, 2000. p. 57-70. Special issue of the forest genetics.
- HIZUME, M.; KONDO, T. Relationships between fluorescent chromosome bands and DNA sequences in conifers. In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.) **Cytogenetics studies of forest trees and shrubs: review, present status, an outlook on the future**. Zioven, Slovakia: Arbora, 2000. p. 71-80. Special issue of the forest genetics.
- HUGHES, C.E. ***Leucaena* - a genetic resources handbook**. Oxford: Oxford Forestry Institute [of] Department of Plant Sciences of University of Oxford, 1998a. 274p. (Tropical Forestry Papers, 37)
- HUGHES, C.E. **Monograph of *Leucaena* (Leguminosae-Mimosoideae)**. New York: The American Society of Plant Taxonomists, 1998b. 175p. (Systematic Botany Monographs, 20).

- HUGHES, C.E. Taxonomy of *Leucaena*. In: SHELTON, H.M.; GUTTERIDGE, R.C.; MÜLLEN, B.F.; BRAY, R.A. (Eds.). *Leucaena*: adaptations, quality and farming systems. Canberra: ACIAR, 1998. p. 27-38. Proceedings of a workshop held in Hanói, Vietnam, February, 1998c.
- HUGHES, C.E.; HARRIS, S.A. Systematics of *Leucaena*: recent findings and applications for breeding and conservation. In: SHELTON, H.M.; PIGGIN, C.M.; BREWBAKER, J.L. (Eds.). *Leucaena* – opportunities and limitations. Canberra: ACIAR, 1995. p. 54-65 (ACIAR Proceedings, 57) Proceedings of a Workshop held in Bogor, Indonesia, January, 1994.
- HUGHES, C.E.; HARRIS, S.A. The characterization and identification of a naturally occurring hybrid in *Leucaena* Benth. (Leguminosae, Mimosoideae). **Plant and Systematic and Evolution**, Austria, n. 192, p. 177-197, 1994.
- HUGHES, C.E.; SORENSON, C.T.; BRAY, R.; BREWBAKER, J.L. *Leucaena* germplasm collections, genetic conservation and seed increase. In: SHELTON, H.M.; PIGGIN, C.M.; BREWBAKER, J.L. (Eds.). *Leucaena* – opportunities and limitations. Canberra: ACIAR, 1995. p. 66-74 (ACIAR Proceedings, 57) Proceedings of a Workshop held in Bogor, Indonesia, January, 1994.
- HUGHES, C.E.; STYLES, B.T. The benefits and risks of woody legume introduction. In: STIRTON, C.H.; ZARUCCHI, J.L. **Advances in Legume Biology**, St. Louis, v. 29, p. 505-531, 1989.
- HUTTON, E.M. Natural crossing and acid tolerance in some *Leucaena* species. **Leucaena Research Report**, Taiwan, n.2, p. 2-4, 1981.
- KAMINSKI, P.E. **Caracterização de germoplasma de *Leucaena* Benth (Leguminosae): comportamento fenológico e taxa de crescimento**. 1998. 119f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- KAMINSKI, P.E.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; PAIM, N.R. Phenology of species of the multipurpose tree genus *Leucaena* Benth. (Leguminosae) growing outside their native range. **Leucnet News**, Oxford, v.7, p.2-10, 2000.
- LEITCH, I.J.; BENNETT, M.D. Polyploid in angiosperms. **Trends in plant science**, Oxford, v. 2, n.12, p. 470-476, 1997.
- LOVE, R. M. **Estudos Citológicos Preliminares de Trigos Rio-Grandenses**. Porto Alegre: Secretaria de Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio, 1949. 23p. (Circular, 74).

- LUBARETZ, O.; FUCHS, J.; AHNE, R. *et al.* Karyotyping of three Pinaceae species via fluorescent *in situ* hybridization and computer-aided chromosome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 411-416, 1996.
- MIGLANI, G.S. **Dictionary of plant genetics and molecular biology**. New York: The Food Products Press, 1998. 348p.
- MOCHALOVA, O. A cytogenetical study of Siberian plum plants and hybrids. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E. **Cytogenetics of forest trees and shrub species**. Zagreb: Croatian Forests, 1997. p. 149-156.
- MORAES FERNANDES, M.I.B. Estudo da instabilidade meiótica em cultivares de trigo – efeito genótipo, relação com fertilidade e seleção de plantas estáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 8, p. 1177-1191, 1982.
- MURATOVA, E.N. Cytogenetic study on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in the Central Yakutia. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E. **Cytogenetics of forest trees and shrub species**. Zagreb: Croatian Forests, 1997. p. 157-177.
- MURATOVA, E.N. Studies on nucleolar chromosomes in representatives of *Pinaceae* Lindl. In: BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E. **Cytogenetics of forest trees and shrub species**. Zagreb: Croatian Forests, 1997. p. 45-72.
- MURATOVA, E.N.; SEDELNIKOVA, T.S. Karyotypic variability and anomalies in populations of conifers from Siberia and the far east. In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.) **Cytogenetics studies of forest trees and shrubs: review, present status, an outlook on the future**. Zloven, Slovakia: Arbora, 2000. p. 129-142. Special issue of the forest genetics.
- NAIR, P.K.R. **An introduction to agroforestry**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. 499p.
- PAN, F.J.; BREWBAKER, J.L. Cytological studies in the genus *Leucaena* Benth. **Cytologia**, Tóquio, v. 53, p. 393-399, 1988.
- PALOMINO, G.; ROMO, G.; ZÁRATE, S. Chromosome numbers and DNA content in some taxa of *Leucaena* (Fabaceae Mimosoideae). **Cytologia**, Tóquio, v. 60, p. 31-37, 1995.
- POEHLMAN, J.M. **Mejoramiento genético de las cosechas**. México: Limura-Willey, 1965.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D.W. Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 467-501, 1998.

- RILEY, R.; CHAPMAN, Y. Genetic control of the cytologically diploid behavior of hexaploid wheat. **Nature**, London, v. 182, p. 713-715, 1958.
- SARMENTO, M.B. **Avaliação do rendimento de matéria seca, qualidade de forragem, taxa de rebrote e tolerância ao frio de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia***. 1999. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- SCHIFINO, M.T.; MORAES FERNANDES, M.I.B. Induction of polyploidy and cytological characterization of autotetraploids of *Trifolium riograndense* Bukart (Leguminosae). **Euphytica**, Berlin, v. 36, p.863-872, 1987.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. *Leucaena* filed research in Rio Grande do Sul. **Leucnet News**, Oxford, v.4, p.28, 1997.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Hybrids between *Leucaena leucocephala* and *L. diversifolia* in Rio Grande do Sul, Southern Brazil: a summary. **Leucnet News**, Oxford, v.7, p.13-15, 2000.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T. The cytogenetics and evolution of forage legumes from Rio Grande do Sul. **Genetics and molecular biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n.4, p. 989-995, 2000a.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL'AGNOL, M. Gametas não-reduzidos no melhoramento de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n.1, p. 169-175, 2001.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; FREITAS, L.H.C.; SIMIONI, C. *et al.* Unreduced gametes in *Leucaena*. **Leucnet News**, Oxford, v. 4, p. 28-29, 1997.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T., CARDOSO, M.B., BOFF, T. *et al* Chromosome numbers and unreduced gametes in species of *Leucaena* Benth (Leguminosae) – new contributions for the taxonomy, evolutionary studies and genetic breeding of the genus. In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.) **Cytogenetics studies of forest trees and shrubs**: review, present status, an outlook on the future. Zioven, Slovakia: Arbora, 2000. p. 181-190. Special issue of the forest genetics.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T; SARMENTO, M.B.; MOTTA, J.L.G. Dry matter yield of *Leucaena leucocephala* x *L. diversifolia* hybrids grow in Rio Grande do Sul – Sourthen Brazil. **Leucnet News**, Oxford, v.6, p.21, 1999.
- SCHIFINO-WITTMANN, M.T; SIMIONI, C. More about unreduced gametes in *Leucaena*. **Leucnet News**, Oxford, v.5, p.21, 1998.

- SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; SIMIONI, C. Unreduced gametes in diploid *Leucaena* species. **Leucnet News**, Oxford, v.6, p.9, 1999.
- ◊ SCHLARBAUM, S. E. Cytogenetic studies of forest trees: looking to the past to meet challenges in the future. In: GUTTENBERGER, H.; BORZAN, Z.; SCHLARBAUM, S.E.; HARTMAN, T.P.V. (Eds.) **Cytogenetic studies of forest trees and shrubs: review, present status, an outlook on the future**. Zloven, Slovakia: Arbora, 2000. p. 09-19. Special issue of the forest genetics.
- SEGRAVES, K.A.; THOMPSON, J.N.; SOLTIS, P.S. *et al.* Multiple origins of polyploidy and the geographic structure of *Heuchera grossularifolia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p. 253-262, 1999.
- SHELTON, H.M.; JONES, R. J. Opportunities and limitations in *Leucaena*. In: SHELTON, H.M.; PIGGIN, C.M.; BREWBAKER, J.L. (Eds.). **Leucaena: opportunities and limitations**. Camberra: ACIAR, 1995. p. 16-23 (ACIAR Proceedings, 57). Proceedings of a workshop held in Bongor, Indonesia, January, 1994.
- SIMIONI, C. **Avaliação de tolerância ao frio e caracterização de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia* ssp. *diversifolia***. 108f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- SIMIONI, C.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; PAIM, N.R. A model for floral inheritance in *Leucaena* (Leguminosae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, p. 365-368, 1998.
- SIMIONI, C.; PAIM, N.R.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Tolerância ao frio e caracterização de híbridos entre *Leucaena leucocephala* e *L. diversifolia*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, p. 453-458, 1999.
- ◊ SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Florida: CRC Press, 1993. 391p.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. Polyploidy: recurrent formations and genome evolution. **Tree**, Berkeley, v. 14, n. 9, p. 348-352, 1999.
- SOLTIS, P.S.; PLUNKETT, G.M.; NOVAK, S.J. *et al.* Genetic variation in *Tropogon* species: additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 82, n. 10, p. 1329-1341, 1995.
- SORENSSON, C.T. Potential for improvement of *Leucaena* through interspecific hybridization. In: SHELTON, H.M.; PIGGIN, C.M.; BREWBAKER, J.L. (Eds.). **Leucaena: opportunities and limitations**. Camberra: ACIAR, 1995. p. 47-53. (ACIAR Proceedings, 57). Proceedings of a workshop held in Bongor, Indonésia, January, 1994.

- SORENSSON, C.T. A breeding strategy for moving acid-soil resistant genes into *L. leucocephala* – opportunities via unreduced gametes. **Leucnet News**, Oxford, v.4, p.22-24, 1997.
- SORENSSON, C.T.; BREWBAKER, J.L. Utilizing unreduced gametes for production of novel hybrids of *Leucaena* species. **Leucaena Research Reports**, Taiwan, n. 8, p. 75-76, 1987.
- SORENSSON, C.T.; BREWBAKER, J.L. Interspecific compatibility among 15 *Leucaena* species (Leguminosae: Mimosoideae) via artificial hybridizations. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 81, n. 2, p. 240-247, 1994.
- STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plant**. London: Addison-Wesley. 1971. 216p.
- STEUSSY, T.F. **Plant taxonomy: a systematic evolution of comparative data**. New York: Columbia University Press, 1990.514p.
- SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant breeding: a personal view. In: LELLEY, T. (Ed.) **CURRENT topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Tullen, Aústria. 1998.p. 22-32.
- TIJO, J.H. The somatic chromosomes of some tropical plants. **Hereditas**, Sweden, v. 34, p. 135-146, 1948.
- ZARATE, S. Reunións del genero *Leucaena* im México. **Anales del Instituto de Biología**, México, v. 65, n.2, p. 83-162, 1994. (Serie Botánica).
- YAN, G.; FERGUSON, A.R.; MCNEILAGE, M.A. *et al.* Numerically unreduced (2n) gametes and sexual polyploidization in *Actinidia*. **Euphytica**, Berlin, v. 96, p. 267-272, 1997.

## **7- APÊNDICES**



APÊNDICE 1 - Determinação do comportamento meiótico em acessos e espécies de *Leucaena*.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I								Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METAFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS	
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal			
<i>L. confertiflora</i> 119/92									
			18	56 II				12	90
			05	A					
			55	?					
<i>L. diversifolia</i> 45/87									
	12	52II	13	52II		02	-	31	77
	02	1 IV	01	3 IV					
	01	2 I	01	1 IV					
	01	M	03	A					
	03	?	02	?					
<b>46/87</b>									
	11	52II	04	52II		02	-	04	68
	27	?	20	?					

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<b><i>L. diversifolia</i></b>											
<b>46/87</b>											
I 1.4	06	52II	01	52 II	01	-	23	21			
	01	1 IV	13	?	01	?					
	05	?			01						
<b>01/90</b>											
III 2.3	13	52II	02	52II			04	42			
	01	2 I	01	1 IV							
	12	?	03	2I e IV							
			05	?							
II 1.5	07	52II	28	52II	03	-	06	74			
	02	A	01	2I	01	?					
	07	?	01	1IV							
			02	2I e 1IV							
			13	?							
<b>82/92</b>											
I 1.5	24	52II	13	52II	01	?	08	55			
	08	?	01	1IV							
II 2.3	05	52II	09	52II			08	49			
	01	2IV	14	?							
	12	?									

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<b><i>L. diversifolia</i></b>											
<b>83/92</b>											
III 2.3	18	52II	12	52II			10				40
III 2.4	31	52II	10	52II	01	-	03				50
			05	?							
<b>126/92</b>											
II 2.5	05	52II	04	52II			06				34
	01	2I	01	1IV							
	12	?	05	?							
II 2.2			01	?	01	Segreg. Dif.	05				06
II 2.3	06	?					03				09
<b>104/94</b>											
I 1.1	05	52II	02	52II	02	-	01				15
			01	?							
III 1.5	02	52II									02
II 1.3	22	52II	19	52II			11				79
	25	?	02	?							

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<b><i>L. diversifolia</i></b> <b>105/94</b>											
I 1.4	02 13	52II ?	08 03 13	52II M ?	01	-	17	57			
III 2.1	02 01 01 04	52II 2I 1IV ?	14 02	52II ?			04	23			
III 2.4	03	52II	03 01	52II ?			01	08			
<b>106/94</b>											
I 2.3	05	52II	02 01	52II ?	02	-	01	15			
II 1.3	22 25	52II ?	19 02	52II ?			11	79			
III 1.5	02	52II						02			
<b><i>L. involucrata</i></b> <b>87/92</b>											
	02	?	09 11 03	56II (III, IV, I) ?	02	?	02	30			

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

## APÊNDICE 1 - Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METAFASE			ANÁFASE		OUTRAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. I. glabrata</i>											
19/81											
I 2.1	06	52II	02	52II							11
	03	1IV									
III 2.3	01	1IV	03	52II							23
			01	2I							
			03	1III							
			15	1 a 2 IV							
<b>32/88</b>											
I 1.2	05	52II	01	52II			01	-	01		46
	08	?	01	1IV							
			10	A							
			19	?							
I 1.3	03	52II	08	52II			22	-	03		40
	03	?									
I 1.4	01	52II	01	52II					05		11
	02	?	02	?							
I 1.5			01	M					12		33
			01	2IV							
			03	1IV + 2I							
III 1.3			07	IV							
			04	52II							04

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<b>L. l. glabrata</b>											
<b>44/88</b>											
II 1.2	02	?	10	?			14			26	
II 1.3	01 14	52II ?	06 23	52II ?	05		12			61	
<b>45/88</b>											
III 2.2	01 02	52II ?	16 15	52II ?	01 02		08			45	
III 2.4			01 02	52II 1IV						03	
III 2.5			07 08	52II ?			02			17	
III 2.3			02 01	52II ?	01		04			08	
II 2.4			09 13	52II ?	01 01		02			26	
<b>145/91</b>											
I 2.2	05	?	04 16	52II ?						25	
III 1.1	02 02	?	15 23	52II ?	02					44	

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. l. glabrata</i>											
<b>145/91</b>											
III 1.4			06	52II							21
			15	?							
<b>34/92</b>											
III 1.1			05	52II	01	-	28				37
			03	?							
<b>92/92</b>											
I 4.3	03	52II	20	52II	01	-	06				31
	01	?									
III 2.1	02	52II	42	52II	01	-					82
	04	?	06	2 a 7 I							
			01	1IV							
			26	?							
<b>95/92</b>											
III 1.2			22	52II			08				67
			37	?							

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I							OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE				
	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	PON/RET (-) Normal			
<b><i>L. l. glabrata</i></b> <b>121/92</b>									
II 2.4	01	52II	10	52II	01	Retard.	07	13	
	01	?	21	?	02	?			
III 2.4			12	?	01	?	03	16	
<b>136/92</b>	03	52II	10	52II	02	-	01	27	
III 1.3	01	?	10	?					
<b>30/93</b>									
I 2.1	10	?	07	52II	02	-	04	41	
			02	M	01	?			
			15	?					
III 2.4	03	52II	10	52II	02	-	01	27	
	01	?	10	?					
<b><i>L. leucocephala</i></b> <b>133/92</b>									
II 1.3	01	52II	16	52II			08	48	
	09	?	14	?					
III 2.3	03	?	21	?			02	26	

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.



APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I							OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METAFASE		ANÁFASE		Nº CEL.		
	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>†</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>†</sup>	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>†</sup>	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>†</sup>	PON/RET (-) Normal			
<i>L. leucocephala</i> 133/92									
III 2.1	01	?	02 03 14 01 01 13	2I 1IV > 52II 2I e 1IV M ?			27	62	
<i>L. pallida</i> 78/92									
I 2.3	07	56II	02 02 01	56II 1IV ?		05	-	17	
III 1.3	09 01 01	56II 1IV ?	06 03 03 04 05	56II 2I 2IV 1IV ?		05		37	

<sup>†</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. pallida</i> 79/92											
I 4.4	01	56II	01	1IV	01	Retard.	49	39			
	02	1IV	26	?	05	?					
	02	2IV									
	14	?									
II 1.4	02	2I	05	?				11			
	02	1IV									
	01	2IV									
	01	?									
<i>L. macrophylla macrophylla</i> 55/88											
	04	2I	01	28II	01	?	08	64			
	01	2IV	06	I, III, IV							
	02	M	01	1IV							
			27	IR							
<i>L. pulverulenta</i> 83/87											
I 4.1	04	28II	11	28II	02	-	18	46			
	05	?	05	?	01	?					

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

## APÊNDICE 1— Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I							Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal		
<b>L. pulverulenta</b>								
<b>83/87</b>								
I 4.2	18	28II	06	28II	01	?	08	73
	20	?	20	?				
I 4.3	20	28II	10	28II	04	-	16	66
	02	1IV	02	1IV	03	?		
	01	2IV	06	?				
	02	?						
<b>84/87</b>								
I 3.1	23	28II	04	28II	16	-	39	165
	03	1IV	17	?				
	02	2IV						
	61	?						
I 3.2	07	28II	01	28II	29	-	63	102
	01	1IV	01	2I	06	?		
	04	?	01	2IV				
			03	1IV				
			13	?				
<b>22/86</b>								
II 2.2	08	28II	05	?	02	-	46	80
	01	1IV			13	?		
	05	?						

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. retusa</i> 23/86 I 3.4	17 02 05 02 01 01 01	26II 2I 1IV 2IV 3IV M ?	19	?	41 07 01	- Retard. ?	66	165			
<i>L. salvadorensis</i> 17/86 III 1.5	08 02	1IV 2IV	06	±50II	07	-	01	23			
<i>L. shannonii</i> 26/84 I 4.1			02 10 07	26II A ?	01 04	- ?	04	28			

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

## APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE				ANÁFASE		OUTRAS		
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. shannonii</i>											
26/84											
I 4.2			03	26II							14
			01	1IV							
			04	A							
			06	?							
II 1.5			02	26II							
			03	A			01	?		04	10
III 1.5			07	26II			02	Retard.			15
			01	2I							
			01	1IV							
			01	2IV							
			01	M							
			02	A							
135/92											
III 2.2	02	2I	12	28II			01	Ponte		07	53
	03	?	01	2I			02	?			
			02	1IV							
			13	A							
			10	?							

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1-- Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE			ANÁFASE		OUTRAS			
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	PON/RET (-) Normal					
<i>L. shannonii</i> 141/92											
1 2.1			08	26II 1IV ?				01			13
1 2.3			05	IR				01			06
1 2.4			03	28II							10
			02	1IV							
			02	IR							
			03	?							
CASTELINHO	01	28II	09	28II			01	01	-		38
	01	?	01	2I			01	01	Retard.		
			21	IR			02	02	?		
<i>L. trichandra</i> 35/88											
1 2.1	12	26II	01	26II			01		?		64
	01	1IV	19	?							
	04	?	?								
1 2.5	03	?	06	?				04			13

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II,III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I										OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		Nº CEL.	PON/RET (-) Normal	Nº CEL.	Nº TOTAL CELULAS		
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>						
<i>L. trichandra</i>												
53/88												
II 1.1	07	26II	01	26II	07	-	07	19	65			
	04	?	01	1IV	10	?	10					
II 1.2	02	26II	16	26II	07	-	07	19	36			
	01	1IV	01	?	05	?	05					
	01	2IV										
03/91												
I 4.1	06	26II	05	26II	09	-	09	59	88			
	01	2I			02	Retard.	02					
	01	1IV										
	01	2IV										
	01	?										
I 4.4	05	26II	01	26II				05	16			
	03	1IV										
	01	2IV										
	01	?										

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I,II, III,IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 1 – Continuação.

ACESSO INDIVÍDUO	Meiose I								OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METÁFASE		ANÁFASE		Nº CEL.	Nº RET (-) Normal		
	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL. ?	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL. ?	Nº CEL. OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL. ?				
<i>L. trichandra</i>										
<b>128/92</b>										
III 2.1	04	26II	10	26II	01	-	01	-	30	87
	17	?	25	?						
<b>131/92</b>										
I 4.5	02	?	14	26II	03	-			17	36
I 4.4	02	?	01	26II					17	23
I 4.3	01	?	08	26II					43	52
<b>137/92</b>										
II 2.3	01	26II	13	26II	01	-	01	-	31	81
	10	?	22	?	03	?		?		
II 2.5	01	26II	02	?					04	08
	01	?								
<b>138/92</b>										
II 2.3	04	26II	15	26II	07	-	07	-	79	144
	07	?	01	21						
	01	M	30	?						

<sup>1</sup> Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.



APÊNDICE 1-- Continuação.

ACESSO INDIVIDUO	Meiose I								OUTRAS	Nº TOTAL CELULAS
	DIACINESE		METAFASE		ANÁFASE		Nº CEL.	PON/RET (-) Normal		
	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>	Nº CEL.	ASSOCIAÇÕES OBSERVADAS <sup>1</sup>				
<i>L. trichandra</i> 138/92										
I 3.1	05	?		09 20	26II ?		02	-		36
<i>L. x spontanea</i> 98/94										
II 1.5	02 05 08	2 a 4I M ?		23 04 34	52II 1IV IR		02 03	- ?	16	98
III 2.4	04 01 02 05	2I 1IV M ?		01 06 01 12	52II 1 a 2 IV M ?		02 01	- ?		35
<i>L. ? hybrid</i> 52/87										
I 1.5	03	IR		03	IR				02	08
II 1.3	58	IR		13	IR		29	?	05	105
III 1.3	02 08	±50II IR		22	IR		31	?	23	86

<sup>1</sup>Associações cromossômicas: I univalentes; II bivalentes; III trivalentes; IV quadrivalentes; A associações do tipo I, II, III, IV e/ou outras não identificadas na mesma célula; M associações múltiplas; IR, diversas anormalidades, incluindo associações não-identificadas, separação precoce, aderências; ? refere-se a células que não puderam ser analisadas devido a extrema sobreposição e contração dos cromossomos ou devido a grande quantidade de gordura na célula.

APÊNDICE 2 - Índice meiótico médio em espécies e acessos de *Leucaena*.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Diades (%)	>4 micrócitos (%)
<b><i>L. confertiflora</i></b>	87/94	III 2.2	93,7	1,7	1,6	3,0
	119/92	II 1.3	88,0	2,0	1,0	9,0
<b><i>L. diversifolia</i></b>	45/87	I 3.1	89,2	2,5	3,3	5,0
		II 2.4	92,0	2,5	2,8	2,7
	46/87	III 2.2	88,7	4,0	4,8	2,5
		I 1.2	89,5	4,5	4,5	4,0
		I 1.3	92,2	1,8	2,0	4,0
01/90	I 1.4	92,0	2,8	4,2	1,0	
	II 1.4	90,7	3,8	4,5	6,2	
	I 4.3	86,7	4,5	3,7	2,8	
	I 4.1	89,5	3,7	4,0	3,5	
	II 1.5	88,2	4,0	4,3	9,3	
82/92	III 2.1	77,5	6,7	6,5	9,3	
	III 2.5	83,7	6,5	6,7	9,3	
	I 1.3	88,2	3,8	4,7	3,3	
	I 1.5	88,0	3,8	2,8	5,0	
	83/92	II 2.2	93,2	2,5	2,0	2,3
II 2.3		88,0	4,0	4,0	4,0	
I 2.3		90,0	4,5	3,0	2,5	
I 2.4		90,2	3,0	4,5	2,3	
III 2.2		88,0	4,0	4,0	4,0	
126/92	II 2.2	86,7	4,5	3,8	5,0	
	II 2.5	84,0	5,0	5,0	6,0	

## APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Díades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. diversifolia</i>	104/94	I 1.3	95,0	1,5	2,3	1,2
		II 2.3	93,2	2,0	2,3	2,5
	105/94	I 4.1	92,5	2,5	2,5	2,5
		I 4.4	93,5	2,7	2,3	1,5
		II 2.3	81,2	3,5	3,3	4,5
		III 2.4	83,5	3,5	3,8	4,3
	106/94	I 2.2	93,7	2,0	2,3	2,0
		I 2.5	92,0	2,5	3,0	2,5
		III 1.2	90,2	4,0	3,8	2,0
	107/94	II 2.2	88,2	5,5	3,8	2,5
		II 2.3	87,0	4,5	3,5	5,0
		II 2.4	86,2	4,0	4,3	5,5
I 3.1		94,2	2,7	1,8	1,3	
<i>L. involuocrata</i>	87/92	II 1.4	90,0	2,5	3,7	3,8
		I 1.2	89,0	4,5	3,2	3,3
<i>L. l. glabrata</i>	19/81	II 1.2	91,5	1,3	2,5	2,2
		II 1.4	85,0	3,7	5,0	3,8
	32/88	I 1.1	83,7	5,3	4,7	6,3
		I 1.3	91,7	2,3	2,0	4,0
<i>L. l. glabrata</i>	32/88	I 1.4	87,0	3,7	4,5	4,8
		II 2.1	89,0	1,5	1,7	7,8
		II 2.3	87,7	5,3	4,3	2,7
		II 2.4	91,7	2,7	2,8	2,8
		III 1.3	86,7	3,8	4,5	2,5

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Diades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. l. glabrata</i>	44/88	I 3.1	89,7	4,8	2,5	
		I 3.5	89,5	2,7	3,5	4,3
		II 1.2	89,7	4,0	3,0	3,3
	45/88	II 1.4	88,2	2,8	4,0	5,0
		I 4.1	92,5	1,8	3,7	2,3
		I 4.2	88,5	5,0	1,8	4,7
		I 4.5	91,7	3,3	4,0	3,5
		II 1.1	90,2	3,2	3,3	3,3
		II 1.2	93,0	2,0	3,0	2,0
	145/91	II 1.4	94,0	1,5	2,0	1,5
		III 2.2	94,5	1,5	1,5	2,5
		I 2.2	89,2	4,5	3,3	3,0
		I 2.3	89,2	3,3	3,5	4,0
		II 2.3	83,5	5,0	6,7	4,8
		II 2.2	89,0	3,5	3,0	4,5
34/92	III 1.4	90,5	2,5	2,8	4,2	
	III 1.5	88,5	4,0	4,7	2,5	
	I 1.2	92,0	2,5	2,7	2,8	
92/92	I 1.3	88,5	4,3	2,2	2,5	
	II 2.3	87,0	4,2	3,8	5,0	
	I 4.1	84,2	5,5	5,0	5,3	
	I 4.5	89,7	2,7	3,3	4,3	
	II 2.2	88,2	2,7	4,3	4,7	
	II 2.3	89,5	3,7	2,8	4,0	

APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Díades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. l. glabrata</i>	92/92	III 2.1	84,5	5,0	5,0	5,5
		III 2.3	88,5	2,3	2,7	4,0
		III 2.4	90,0	5,0	2,5	2,5
	95/92	I 4.2	89,7	3,8	1,7	4,8
		I 4.3	92,5	2,3	2,5	2,7
		II 2.3	87,0	3,7	4,0	5,3
	121/92	I 4.3	89,2	2,5	3,5	4,8
		I 4.4	89,2	2,3	5,0	3,5
		II 2.2	88,2	4,0	4,0	3,8
	136/92	III 2.4	91,2	3,3	2,5	3,0
		I 2.1	89,5	3,8	3,0	3,7
		I 2.2	88,5	3,7	3,5	4,3
139/92	I 2.4	91,2	3,0	2,0	3,8	
	III 1.2	89,0	3,5	4,3	1,7	
	III 1.3	92,5	3,5	1,7	2,3	
30/93	I 4.1	86,2	4,5	4,3	2,5	
	II 2.3	91,7	2,7	2,8	2,8	
30/93	I 2.1	87,7	3,0	4,3	5,0	
	I 2.3	89,2	4,8	3,0	3,0	
	I 2.4	91,0	3,5	3,3	2,2	
	II 2.1	89,2	3,5	3,3	3,7	
	III 2.1	91,0	2,2	2,8	4,0	
		III 2.3	88,2	4,5	3,3	4,0

APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Díades (%)	>4 micrócitos (%)		
<i>L. leucocephala</i> <i>leucocephala</i>	133/92	I 3.1	95,5	2,0	2,5	2,3		
		I 3.2	95,0	2,7				
		I 3.4	99,5		0,5			
		I 3.5	99,0	0,5				
		II 1.1	99,5		0,5			
		II 1.2	96,7	2,0		0,8		
		II 1.3	99,2	0,3				
		II 1.4	98,5	0,5		0,5		
		III 2.1	97,2	1,3		1,5		
		147/92	I 2.1	98,2			1,8	
		I 2.2	97,2	0,7		2,0		
		<i>L. pallida</i>	78/92	I 2.3	97,7	0,8	1,5	
				I 2.4	97,0	2,0	1,0	
II 1.2	98,5			1,0	0,5			
II 1.3	99,5				0,5			
II 1.4	95,0			2,0		3,0		
III 1.3	99,0				0,2	0,8		
79/92	I 4.1			96,5	2,5	1,0		
I 4.2	98,5				1,0	0,5		
I 4.4	99,7					0,3		
I 4.5	95,5			2,8		1,7		
III 2.2	98,0	0,5	1,5					
<i>L. cuspidata</i>	83/94	I 4.4	99,5		0,5			

APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Diades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. lanceolata</i>	43/85	I 3.1	97,5	1,5	1,0	
		I 3.3	91,7	2,5	2,5	3,3
		I 3.5	99,0	1,0	1,0	
	44/85	I 1.4	96,0	1,7	2,3	
<i>L. pulverulenta</i>	83/87	I 4.1	99,0	1,0	1,3	0,5
		I 4.2	98,2		1,0	
	I 4.3	98,2	0,8			
	I 4.4	98,7				
	I 4.5	97,2	1,8			
	II 2.1	100				
	II 2.2	95,7	1,3		1,5	
	II 2.3	98,7	0,8		0,5	
	II 2.4	99,0	0,3		0,7	
	II 2.5	99,5		0,5		
84/87	I 3.1	99,2		0,3		
	II 2.1	98,7		0,7		
	II 2.2	94,7		1,6		
	II 2.3	100				
	II 2.5	98,5		0,5	1,0	
		III 2.2	99,5		0,5	
22/86	I 2.2	98,2			1,0	
	II 2.2	99,2			0,5	
	III 1.2	97,0	1,3		1,5	
<i>L. retusa</i>	23/86	I 3.4	98,7		1,3	
						0,8
					0,3	
					1,5	
					0,2	

## APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Díades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. salvadorensis</i>	17/86	III 1.5	73,5	10,0	9,0	7,5
<i>L. shannonii</i>	26/84	I 4.1	88,5	4,2	3,0	4,3
		I 4.2	85,2	4,8	5,7	4,3
		II 1.5	85,7	4,0	5,5	4,8
	135/92	II 2.3	85,0	4,7	5,0	5,3
	141/92	CAST.	89,2	3,7	3,7	3,3
		I 2.3	81,2	5,5	6,0	7,3
		I 2.5	81,2	9,0	6,3	6,0
		III 2.5	96,5	2,3	1,2	
<i>L. trichandra</i>	35/88	I 2.1	93,5	2,5	1,7	2,3
		I 2.2	90,5	4,5	5,0	
		I 2.4	97,5		2,5	
		II 2.3	94,7	2,8	2,5	
		II 2.4	97,2		2,8	
		III 2.3	94,2	2,5	0,8	2,5
		III 2.4	99,2			0,8
		III 2.5	98,2			1,8
		I 4.4	95,5	2,0		2,5
		II 1.2	93,7	2,5		1,0
		II 1.4	90,7	2,5		2,5
53/88	03/91	I 4.1	93,7		3,5	2,8
		I 4.2	94,5	2,5	3,0	
		I 4.3	98,7			1,3
		I 4.4	98,0	0,2	1,8	
		I 4.5	97,2	1,0	1,8	



APÊNDICE 2 - Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	Tétrades (%)	Triades (%)	Díades (%)	>4 micrócitos (%)
<i>L. trichandra</i>	03/91	II 1.1	94,2	2,5	3,3	
		II 1.2	88,8	3,5	3,7	4,3
		II 1.3	96,0		2,5	1,5
		II 1.4	94,5	3,3	2,5	
		II 1.5	97,7		1,0	1,3
	128/92	III 2.2	96,0	2,3	1,7	
		III 2.4	94,5	3,0	2,5	
		I 2.2	97,7	0,8	1,5	
		I 2.4	99,5		0,5	
		II 1.1	97,7	1,8		0,5
131/92	II 1.5	94,7	1,5	1,5	2,3	
	137/92	I 3.4	92,5	3,5	2,3	1,7
		II 2.3	93,7	2,5	1,8	2,0
		II 2.5	88,7	2,5	3,8	5,0
138/92	I 3.1	97,5	1,3	1,0		
	II 1.3	98,0	1,5	0,5		
<i>L. x spontanea</i>	98/94	I 4.5	95,5	2,0	2,5	
		II 1.4	97,7	0,8		1,5
<i>L. ? hybrid</i>	52/87	II 1.3	65,0	10,0	10,0	15,0

APÊNDICE 3: Estimativa da fertilidade média de grãos de pólen (GP) em acessos e espécies de *Leucaena*.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viável	Inviável	Viável	Inviável		
<i>L. confertiflora</i>	87/94	III 2.2	87,0	1,2	11,8							
	119/92	II 1.3	69,0		31,0							
	45/87	II 2.3	93,3		6,7							
<i>L. diversifolia</i>		II 2.4	92,2		7,8							
		II 2.5	91,0		9,0							
		III 2.1	85,6	2,5	11,8							
		III 2.2	70,2		29,8							
	46/87	I 1.1	51,3	24,3	24,3							
		I 1.2	63,0	14,2	22,8							
		I 1.3	72,6	10,8	16,5							
		I 1.4	80,0	3,0	18,8							
		II 1.3	77,3	8,3	14,3							
		II 1.4	74,2	9,8	16,0							
	III 2.3	80,0	7,0	13,0								
01/90		I 4.1	76,0	8,3	15,6							
		I 4.2	82,8	6,2	11,0							
		I 4.3	73,8	6,8	19,3							
		I 4.4	82,0	7,0	11,0							
		II 1.5	79,8	9,5	10,6							
		III 2.1	66,3	9,0	24,6							
		III 2.3	70,6	7,5	21,8							
		III 2.4	76,8	9,0	14,2							
		III 2.5	65,2	13,2	21,3							
	82/92	I 1.3	81,3	3,7	15,0							0,2



## APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável	Viável	Inviável
<i>L. diversifolia</i>	104/94	II 2.1	76,3		15,2		8,5							
		II 2.2	72,5		8,5		19,0		0,2		0,3			
		II 2.3	80,8		6,8		12,3							
		III 1.5	80,0		5,5		14,5							
	105/94	I 4.1	74,8				26,7		0,2					
		I 4.2	74,3				27,3		0,2					
		I 4.3	65,2				34,8							
		I 4.4	75,3				24,0		0,6					
		I 4.5	78,7				21,3							
		II 2.1	70,2				29,5		0,3					
		II 2.3	79,0				21,0							
		II 2.4	72,3				27,6							
		II 2.5	80,0				20,0							
		III 2.1	87,5				12,5							
106/94	III 2.2	88,0				12,0								
	III 2.3	93,3				6,6								
	III 2.4	78,0				22,0								
	III 2.5	69,3				30,6								
	I 2.1	86,5			2,0	11,5								
	I 2.2	85,2			2,0	14,5								
	I 2.3	83,2			4,8	11,0		1,0						
	I 2.4	84,6			1,2	14,2								
	I 2.5	80,8			5,0	14,2								

APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viável	Inviável	Viável	Inviável		
<i>L. diversifolia</i>	106/94	II 1.1	78,3		5,6		16,0					
		II 1.2	78,2		8,3		12,5					
		II 1.3	86,0		2,5		11,5					
		II 1.4	81,0		12,0		7,0					
		II 1.5	79,0		9,6		11,3					
107/94		III 1.2	81,2		3,2		15,6					
		III 1.4	59,5		8,5		27,0					
		II 2.1	57,8		13,0		28,5		0,7			
		II 2.2	63,0		7,5		28,6		0,8			
		II 2.3	46,3		21,6		29,2		2,3			
<i>L. involucrata</i>	87/92	II 2.4	61,5		13,5		24,8		0,2			
		II 2.5	42,3		16,6		40,6		0,3			
		I 3.1	88,7		2,5		8,8					
		II 1.4	92,0		1,0		7,0					
		III 2.1	86,8				13,2					
<i>L. l. glabrata</i>	19/81	III 2.4	88,8				11,2					
		I 1.2	81,5		13,3		11,2					
		II 1.1	87,2		1,6		10,8					
		II 1.2	50,0		42,6		7,3					
		II 1.3	67,5		23,8		8,6					
32/88	I 1.1	II 1.4	69,8		16,8		13,3					
			72,3		11,3		16,3					

APÊNCIDE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen		
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	
<b><i>L. l. glabrata</i></b>	32/88	I 1.2	87,0		6,0		8,5						
		I 1.3	85,0		6,0		9,0						
		I 1.4	79,0		6,3		14,6						
		I 1.5	67,3		17,5		15,2						
		II 2.1	71,0		23,5		13,8						
		II 2.2	81,2		3,7		15,2						
		II 2.3	84,2		3,7		12,7						
		II 2.4	89,0		1,5		9,5						
		III 1.4	75,7		9,3		13,3						
		III 1.3	78,7		8,0		13,3						
		44/88		83,7		4,8		11,5					
		I 3.3		87,5		1,7		10,8					
		I 3.4		73,0		7,5		19,5					
		I 3.5		83,2		4,5		12,3					
		II 1.1		71,8		7,3		20,8					
II 1.2		81,7		5,8		10,8							
II 1.3		67,7		14,8		17,5							
II 1.4		72,0		10,0		12,2							
II 1.5		76,0		10,3		13,7							
45/88		88,2		4,5		6,7							
I 4.2		81,8		7,0		11,2							
I 4.3		80,8		10,7		8,5							

## APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen		
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	
<i>L. l. glabrata</i>	45/88	I 4.5	81,0		7,7		11,2						
		II 1.1	81,3		8,2		10,5						
		II 1.2	83,0		6,5		11,2						
		II 1.3	84,0		5,8		10,0						
		II 1.4	88,7		2,3		7,3						
		II 1.5	77,3		10,2		12,5						
		III 2.2	86,7		4,3		9,0						
		III 2.3	77,8		8,2		14,0						
		III 2.4	78,5		9,0		12,5						
		III 2.5	86,5		8,2		5,3						
		145/91											
				I 2.1	79,7		9,8		10,5				
				I 2.2	83,5		5,2		11,3				
				I 2.3	87,7		2,3		10,0				
				I 2.4	81,5		5,7		12,8				
		II 2.1	78,5		8,0		13,5						
		II 2.2	83,3		5,5		11,2						
		II 2.3	76,7		7,3		16,0						
		III 1.1	82,8		6,3		9,2	1,3		0,3			
		III 1.2	86,5		4,0		9,5						
		III 1.4	83,0		6,2		10,8						
		III 1.5	79,0		9,8		11,7						

## APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen		Micropólen		
			Víáveis	Inviáveis	Víáveis	Inviáveis	Víáveis	Inviáveis	Víáveis	Inviáveis	Víáveis	Inviáveis	Víáveis	Inviáveis	
<i>L. l. glabrata</i>	34/92	I 1.1	71,7	9,7	18,7										
		I 1.2	81,7	6,8	9,8										
		I 1.3	79,8	7,7	12,5										
		I 1.4	74,3	8,5	17,0										
		II 2.1	78,0	11,8	10,2										
		II 2.2	71,2	10,8	18,0										
		II 2.3	81,0	5,3	14,5										
		92/92	I 4.1	76,7	5,8	17,5									
			I 4.2	84,3	6,3	9,3									
	I 4.3		81,8	7,0	11,2										
	95/92	I 4.5	82,5	6,5	11,0										
		II 2.1	80,8	6,3	12,8										
II 2.2		81,7	3,8	14,5											
II 2.3		83,0	5,0	12,0											
III 2.1		75,3	6,5	17,2						1,2					
III 2.3		74,2	13,7	11,3						0,8					
95/92	III 2.4	80,8	8,7	10,5											
	III 2.5	83,7	5,7	10,7											
	I 4.1	78,7	11,8	9,5											
I 4.2	68,5	21,2	10,3												
I 4.3	80,5	11,0	8,5												



## APÊNCIDE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável		
<i>L. l. glabrata</i>	95/92	I 4.4	82,7		7,0		10,3					
		I 4.5	84,7		4,2		11,2					
		II 2.1	72,7		12,5		14,8					
	121/92	II 2.3	81,7		6,0		12,3					
		III 1.2	82,5		5,3		12,2					
		I 4.3	66,7		18,2		16,8					
	136/92	I 4.4	86,8		2,5		10,7					
		II 2.1	80,0		5,3		14,0					
		II 2.2	81,0		4,5		14,5					
	136/92	II 2.4	76,7		7,7		15,6					
		III 2.3	45,8		26,8		27,3					
		III 2.4	84,8		5,8		9,3					
	136/92	I 2.1	84,5		4,2		11,3					
		I 2.2	81,3		7,2		11,0					
		I 2.3	83,8		5,0		11,2					
I 2.4		86,2		4,7		9,2						
I 2.5		87,7		4,3		8,0						
136/92	III 1.2	83,0		4,5		9,5						
	III 1.3	87,2		4,2		8,7						
	III 1.4	81,2		7,3		11,5						
III 1.5	88,2		4,7		7,2							



APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável
<i>L. l. leucocephala</i>	133/92	III 2.4	80,2	12,3	7,7							
		III 2.5	84,3	12,0	3,7							
	147/92	I 2.1	93,0	3,2	3,8							
		I 2.2	94,7	3,2	2,2							
		II 2.1	93,2	5,5	1,3							
		II 2.2	87,0	7,7	5,3							
		II 2.3	76,7	9,8	13,5							
		II 2.4	75,8	17,3	5,2							
		III 1.3	83,0	9,5	7,5							
		<i>L. pallida</i>	78/92	I 2.3	95,3	2,3	2,3					
I 2.4	89,7			5,2	4,2	1,0						
79/92	II 1.1		96,8	2,5	0,7							
	II 1.2		97,0	3,0								
	II 1.3		97,5	2,5								
	II 1.4		97,3	2,0								0,7
	II 1.5		98,2	0,8	1,0							
	III 1.3		85,8	9,7	4,2							0,3
	III 1.5		89,7	10,2								0,2
	I 4.1		94,5	5,5								
I 4.2	95,5	4,5										
I 4.3	96,2	3,8										
I 4.4	95,3	4,7										



## APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Aces so	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	Viáveis	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável		
<b><i>L. pulverulenta</i></b>	83/87	I 4.5	98,5	0,2	1,0		0,3					
		II 2.1	97,5	0,3	0,8		1,3					
		II 2.2	97,5	0,8	1,7							
		II 2.3	98,0	0,8	1,2							
		II 2.4	98,2	0,3	1,5							
	II 2.5	98,3	0,2	1,5								
	84/87	I 3.1	99,0	0,3	0,5		0,2					
		I 3.2	97,5	0,5	2,0							
		I 3.3	97,8	0,8	1,3							
		I 3.4	97,7	1,5	0,8							
I 3.5		98,3	0,8	0,8								
<b><i>L. retusa</i></b>	23/86	II 2.1	98,5	0,8	1,2							
		II 2.2	96,0	2,7	1,3							
	17/86	II 2.3	97,5	1,8	0,7							
		II 2.5	98,0	0,8	1,2							
		III 2.2	98,8	0,7	0,3		0,2					
	III 1.5	98,8	1,0			0,2						
	<b><i>L. salvadorensis</i></b>	17/86	I 1.5	85,3		14,7						
III 1.5			57,7		43,3							

APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP Viáveis	Viáveis	GP Viáveis	Inviáveis	GP Viáveis	Inviáveis	GP Viáveis	Inviáveis	GP Viáveis
<i>L. shannonii</i>	26/84	I 4.1	77,8	10,2	12,0							
		I 4.2	87,0	3,7	9,3							
		II 1.4	88,3	3,0	8,7							
		II 1.5	86,2	4,3	9,3							
		III 1.5	87,2	2,8	10,0							
	135/92	II 2.1	66,3	7,8	24,2							
		II 2.3	81,8	6,0	12,2							
	141/92	I 2.1	78,0	9,0	13,0							
		I 2.3	90,0	3,0	7,0							
		I 2.4	85,2	4,7	10,2							
		I 2.5	87,2	4,8	8,0							
		II 1.3	79,8	6,7	11,6							
		III 2.5	96,0	0,3	3,7							
		cast	83,5	4,3	12,2							
I 2.1		89,0	2,0	1,7	7,0					0,5		
<i>L. trichandra</i>	35/88	I 2.2	88,8	1,0	0,8							
		I 2.4	95,3	3,3	4,8							
		II 2.3	90,3	3,3	6,3							
		II 2.4	97,7	0,5	2,3							
		II 2.5	94,8	1,7	4,0							
	53/88	I 4.4	89,5	1,7	8,5							
		II 1.1	72,8	3,3	23,5	0,2					0,2	
		II 1.2	90,2	2,8	7,2							
		II 1.4	78,5	5,3	16,2	0,2						0,2

APÊNCIDE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	GP	Viáveis	GP	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável	Viável	Inviável
<i>L. trichandra</i>	03/91	I 4.1	90,7		3,7		5,5		0,2				0,2	
		I 4.2	92,2		2,5		5,2		0,2					
		I 4.3	95,8		0,7		4,0							
		I 4.4	96,5		0,7		3,3							
		I 4.5	93,3		0,2		7,7							
		II 1.1	86,3		1,0		6,3		6,3					
		II 1.2	77,3		5,8		18,2		0,5					
		II 1.3	93,5		0,3		4,8		1,2				0,2	
		II 1.4	89,7		4,0		6,3							
		II 1.5	94,8		1,8		3,3							
		III 2.2	90,2		3,3		6,5					0,2		
		III 2.3	88,2		3,5		7,3		1,0					
		III 2.4	88,2		1,7		4,8		3,5		0,2			
		III 2.5	92,3		2,0		4,2						1,5	
		128/92		I 2.1	86,5		4,3		9,2					
		I 2.2	88,0		4,0		8,0							
		I 2.3	88,8		3,7		7,7							
		I 2.4	98,2		0,5		1,3							
		II 2.5	81,3		7,7		10,7		0,2		0,2			
		III 2.1	77,9		6,8		5,2							
		III 2.2	73,6		6,9		17,6							
131/92		II 1.1	90,8		1,8		7,2		0,2					
		II 1.5	92,8		1,0		6,2							
137/92		I 3.4	89,0		2,8		8,2							
		II 2.3	82,0		9,2		8,5							
		II 2.5	75,3		10,0		14,7		0,6		0,2			

## APÊNDICE 3: Continuação.

Espécie	Acesso	Indivíduo	GP		GP Parcial.		GP		Macropólen		Macropólen		Micropólen	
			Viáveis	Viáveis	Viáveis	Inviáveis	Viável	Inviável	Viável	Inviável	Viável	Inviável		
<b>L. trichandra</b>	138/92	I 3.1	95,2	2,3	2,3	2,3	0,8							
		II 1.3	92,7	1,5	5,7							0,2		
<b>L. x spontanea</b>	98/94	I 4.5	96,3	1,3	2,3									
		II 1.2	84,2	7,2	8,7									
		II 1.3	84,2	5,0	10,8									
		II 1.4	98,2	1,2	0,5								0,2	
		III 2.4	84,5	7,8	7,2			0,5						
<b>L. ? hybrid</b>	52/87	I 1.3	79,7		18,8									
		I 1.5	27,0		67,2			5,3				0,2		
		III 3.1	40,5	3,7	55,6							0,2		



## 8. VITA

Tatiana Boff, filha de Osvaldo Luiz Boff e Ivone dos Santos Boff, nasceu em 27 de novembro de 1976, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Cursou ensino fundamental na Escola Estadual de 1º grau Rauí Pilla e o ensino médio na Escola Técnica de Comércio, da UFRGS – Técnico em Processamento de Dados (Porto Alegre – RS) de 1992 a 1994. Em 1995 ingressou na Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde graduou-se em Licenciatura em Biologia em fevereiro de 2000. Foi bolsista de Iniciação Científica CNPq desde 1992, nos departamentos de Genética e de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia desta Universidade. Em março de 2000 iniciou seus estudos de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.