



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**VARIABILIDADE GENÉTICA E VARIAÇÃO DE PLOIDIA EM ESPÉCIES DE
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae) COM DIFERENTES SISTEMAS
REPRODUTIVOS.**

Aluna: Rafaela Cabral Marinho

Orientador: Prof. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

UBERLÂNDIA - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**VARIABILIDADE GENÉTICA E VARIAÇÃO DE PLOIDIA EM ESPÉCIES DE
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae) COM DIFERENTES SISTEMAS
REPRODUTIVOS.**

Aluna: Rafaela Cabral Marinho

Orientador: Prof. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área:
Genética).

UBERLÂNDIA - MG

2013



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M338v Marinho, Rafaela Cabral, 1988-
2013 Variabilidade genética e variação de ploidia em espécies de
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae) com diferentes sistemas
reprodutivos / Rafaela Cabral Marinho. -- 2013.
140 f. : il.

Orientador: Ana Maria Bonetti.

Coorientador: Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Genética vegetal - Teses. 3. Plantas - Reprodução - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Oliveira, Paulo Eugênio Alves Macedo de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Palavras-chave: Apomixia, *Eriotheca*, morfometria, poliploidia e variabilidade genética.



**VARIABILIDADE GENÉTICA E VARIAÇÃO DE PLOIDIA EM ESPÉCIES DE
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae) COM DIFERENTES SISTEMAS
REPRODUTIVOS.**

ALUNA: Rafaela Cabral Marinho

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Examinadores: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba (UFABC)

Prof. Dr^a. Rute Magalhães Brito (UFU)

Prof. Dr. Clesnan Mendes Rodrigues (UFU)

Prof. Dr^a. Diana Salles Sampaio (UFU)

Data da Defesa: 29/07/2013

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr^a Ana Maria Bonetti



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me fortalecido e me abençoado durante este trabalho.

À minha mãe Maria Helena pelo amor incondicional. À Minha irmã Izabela pelo incentivo e pelos bons momentos juntas.

À minha família e ao meu namorado Denis pelo apoio, incentivo e compreensão. Amo muito vocês!

Aos meus eternos amigos do Laboratório de Genética (Labgen), por todos os bons momentos e por todos aqueles momentos difíceis os quais estiveram ao meu lado.

Agradeço aos meus orientadores por todos os valiosos ensinamentos. À Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti por me ensinar a ser uma pessoa e uma cientista melhor. Ao Prof Dr Paulo Eugênio Oliveira pela confiança, por todos os conselhos, oportunidades e compreensão nos momentos difíceis.

À Diana pelas conversas tranquilizantes, pela amizade, pelo apoio nas coletas e nas análises estatísticas.

Ao Clesnan por toda a confiança, dedicação e apoio nos nossos trabalhos e nas coletas.

Ao Prof Dr Eduardo Leite Borba pela contribuição desde o início deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

À Capes pela bolsa de estudos e ao CNPq e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



*Dedico este trabalho a minha mãe,
minha eterna fonte de inspiração.*



SUMÁRIO

Resumo	11
<i>Abstract</i>	12
<i>Capítulo 1</i> Fundamentação teórica	
1. Introdução	13
1.1 Reprodução em plantas	13
1.1.1 <u>Apomixia</u>	15
1.1.2 <u>Poliembrionia e poliploidia em apomíticos</u>	17
1.1.3 <u>Fatores genético e consequências populacionais da</u> <u>apomixia</u>	17
1.1.4 <u>Distribuição de apomíticos</u>	19
1.2 Sistema de estudo: Malvaceae (subfamília: Bombacoideae; <i>Eriotheca</i>)	20
1.3 Estudos da ploidia e variação genética em plantas	24
1.4 Hipóteses e Objetivos	25
2. Referências Bibliográficas	27
<i>Capítulo 2</i> Variabilidade genética e variação de ploidia em espécies de <i>Eriotheca</i> (Bombacoideae – Malvaceae) com diferentes sistemas reprodutivos.	
Resumo	38
<i>Abstract</i>	39
Introdução	40
Materiais e métodos	43
Áreas de coleta	43
Biologia molecular	44
1. Extração do DNA genômico	44



2. Amplificação dos fragmentos ISSR (Inter simple sequence repeat)	45
3. Análise dos dados	46
Resultados	47
Discussão	56
Referências Bibliográficas	59
<i>Capítulo 3</i> Relação entre ploidia e tamanho do pólen e do estômato de citótipos de <i>Eriotheca gracilipes</i> e <i>Eriotheca pubescens</i> .	
Resumo	67
<i>Abstract</i>	68
Desenvolvimento	69
Referências Bibliográficas	77
Material Suplementar	81
<i>Capítulo 4</i> Chromosome numbers reflect the phylogeny of Malvaceae? New counts for the Bombacoideae and a review of cytology in the Malvaceae l.s.	
Abstract	85
Introduction	86
Materials and Methods	89
Studied materials	89
Cytogenetic analysis	89
Statistical analyses	92
Resultados	92
Discussão	93
Referências bibliográficas	98
Considerações finais	140



Lista de tabelas

Página

Capítulo 2

Tabela 1. Locais de coleta, coordenadas geográficas e número amostral (*N*) 43
das populações monoembriônicas ou poliembriônicas de *E.gracilipes* e *E.*
pubescens amostradas.

Tabela 2. Primers usados, sequências e temperatura de anelamento 45
otimizada para a amplificação de loci ISSR de *Eriotheca*.

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) das populações de 49
Eriotheca.

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética: *P* = porcentagem de bandas 50
polimórficas; *I* = Índice de Shannon; *H_e* = Heterozigosidade média esperada
em quatro populações de *Eriotheca*.

Capítulo 3

Tabela S2. Valores médios da largura, altura e área dos grãos de pólen de 81
E.gracilipes e *E. pubescens*.

Tabela S1. Valores médios da largura e altura dos estômatos de *E.* 82
gracilipes e *E. pubescens*.

Capítulo 4

Table 1. Chromosome numbers for some Cerrado region Bombacoideae. 103
Embryonic patterns from Mendes-Rodrigues (2005).

Table 2. Estimative Genome size of *Eriotheca gracilipes* and *E. pubescens* 104
(Malvaceae) with different embryonic patterns.

Annex 1. List of chromosome numbers for Malvaceae s.l. Compiled from the 108
Index of Plant Chromosome Numbers and including the original counts
presented here.



Lista de Figuras

Página

Capítulo 1

Figura 1. Esquema representando as etapas da reprodução sexual e 14
apomítica ocorrentes em óvulos e sementes. Fonte: KOLTUNOW;
GROSSNIKLAUS, 2003.

Figura 2. Filograma de combinação dos dados de ITS, *trnLF* e *matK* para o 23
core Bombacoideae. Fonte: Duarte et al., 2011.

Capítulo 2

Figura 1. Mapa de distribuição das populações de *Eriotheca*. 44

Figura 2. Representação dos escores da análise de coordenadas principais 51
PCO) da matrix de distância genética de 74 indivíduos de quatro populações
de *Eriotheca*, baseado em 111 loci ISSR. Porcentagem da variância
acumulada na Axis 1= 64,36%, Axis 2 = 14,09% e Axis 3 = 12,13%.
Legenda *E. gracilipes* monoembriônica (EGM), poliembriônica (EGP); *E.*
pubescens monoembriônica (EPM) e poliembriônica (EPP).

Figura 3. Dendograma Neighbor-joining com base na distância genética não 53
tendenciosa de Nei entre as populações de *Eriotheca*. Número sobre o ramo
refere-se ao valor de *bootstrap*. Legenda *E. gracilipes* monoembriônica
(EGM), poliembriônica (EGP); *E. pubescens* monoembriônica (EPM) e
poliembriônica (EPP).

Figura 4. Dendograma Neighbor-joining baseado na distância genética não 53
enviesada de Nei a partir de 111 loci ISSR de 74 indivíduos de *Eriotheca*. A.
Indivíduos das duas populações de *E. gracilipes* (1-17 população
monoembriônica; 18-36 população poliembriônica). B. Indivíduos das duas
populações de *E. pubescens* (37-55 população monoembriônica e 56-74
população poliembriônica).

Figura 5. Quantidade de loci que diferencia indivíduos comparados par a 54
par, obtidos com análise de genótipos multiloci. A. *E. gracilipes*. B. *E.*
pubescens.

Figura 6. Análise Bayesiana de 74 indivíduos de *Eriotheca*. A. Gráfico ΔK . 55
B. Gráfico LnP (D) resultante de 15 corridas independentes. C.
Representação gráfica de dois grupos genéticos (K=2) em EGM, EGP,
EPM, EPP. O real número de grupos genéticos correspondem ao maior
valor de ΔK e estabilização de LnP (D).



Capítulo 3

Figura 1. Altura média em μm dos estômatos nos citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,837} = 286,724$; $p < 0,001$). 74

Figura 2. Largura média em μm dos estômatos nos citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,837} = 423,869$ $p < 0,001$). 74

Figura 3. Diâmetro mínimo em μm dos grãos de pólen de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,1080} = 152,875$ $p < 0,001$). 75

Figura 4. Diâmetro máximo em μm dos grãos de pólen de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,1080} = 252,826$ $p < 0,001$). 75

Figura 5. Área média em μm^2 dos grãos de pólen de citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,1080} = 654,747$ $p < 0,001$). 76

Capítulo 4

Figure 1. Mitotic metaphasic plates from root meristem cells of some Malvaceae-Bombacoideae of the Brazilian Cerrados. 105

Figure 2. Mean chromosome number (and standard error) in each subfamily of Malvaceae s.l. 106

Figure 3. Frequency of species or cytotypes with different chromosome counts in the subfamilies Malvoideae and Bombacoideae (Malvaceae s.l.). 107

Resumo

A reprodução nas plantas é, predominantemente, sexuada embora a assexualidade tem sido documentada em vários táxons. A apomixia, foco destes estudos, é definida como a produção de sementes sem fecundação, em que embriões se desenvolvem diretamente do tecido materno, sendo teoricamente geneticamente idênticos à planta mãe. A presença da poliembrião (formação de mais de um embrião por semente) e da poliploidia em espécies do Cerrado evidenciam a apomixia. Para avaliar todos estes fenômenos, foram escolhidas duas espécies que apresentam mosaico reprodutivo e citotípico do gênero *Eriotheca* (subfamília Bombacoideae, família Malvaceae) ocorrentes no Cerrado brasileiro. As consequências dos diferentes sistemas reprodutivos na estrutura genética de populações apomíticas e sexuais foram avaliadas com marcadores moleculares dominantes ISSR (*Inter Simple Sequence Repeated*). Populações apomíticas, poliplóides e poliembriônicas de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens* apresentaram índices de diversidade muito próximos ou até maiores do que populações sexuais. Os citótipos das espécies de *Eriotheca* foram analisados quanto à morfometria do grão de pólen e de estômatos, como inferência da ploidia. A análise mostrou que as duas estruturas são eficientes para realizar a estimativa, propiciando futura ampliação deste estudo para uma escala regional. Foi feita uma análise do número cromossômico para algumas espécies de Bombacoideae, juntamente, com uma compilação de dados cromossômicos de espécies de Malvaceae para entender como esta característica varia na família. Os resultados mostraram novidades citogenéticas e evolução cromossômica indicando que a duplicação do genoma parece ser uma característica da subfamília Bombacoideae, que possui números cromossômicos significativamente maiores do que as outras subfamílias.

Palavras-chave: Apomixia, *Eriotheca*, morfometria, poliploidia e variabilidade genética.

Abstract

Reproduction in plants is predominantly sexually, although asexuality has been documented in many taxa. Apomixis is the focus of this study, defined as the production of seeds without fertilization, in which embryos develop directly from the maternal tissue, and are genetically identical to the mother plant. Polyembryony (formation of more than one embryo per seed) and polyploidy are commonly associated with the Cerrado species that show apomixis. Apomictic taxa show different cytotypes and reproductive mosaics that are good targets for study. Thus, we selected two species of the genus *Eriotheca* (subfamily Bombacoideae, family Malvaceae) from the Brazilian Cerrado, which have reproductive and cytotypic mosaic. Dominant markers ISSR (Inter Simple Sequence Repeated) were used to evaluate the consequences of apomixis and sexual reproduction on the population's genetic structure. The results showed that apomictic, polyploid and polyembryonic populations have diversity indices very close or even greater than sexual populations. Cytotypes of *Eriotheca* species were analyzed for morphology pollen grain and stomata as inference of ploidy. These analyses showed that the two structures are efficient to perform this estimate, providing basic procedures for a study in a regional scale. Finally, an analysis of chromosome numbers for some Bombacoideae species and a compilation of chromosome number for species of Malvaceae s.l. was carried out to see how these numbers varied in the family. This study demonstrated some new chromosome number and a clear chromosomal evolution, indicating that a whole genome duplication seems to be a feature of the Bombacoideae subfamily, which has chromosome numbers significantly higher than the other subfamilies.

Keywords: Apomixis, *Eriotheca*, genetic variability, morphometry and ploidy

1. Fundamentação teórica

O sistema reprodutivo nas Angiospermas varia entre o sistema sexuado, que requer polinização e fertilização, e a reprodução assexual como a reprodução vegetativa e apomixia (RICHARDS, 2003; HÖRANDL, 2010; VALLEJO-MARÍN et al., 2010). A apomixia é a formação de sementes viáveis sem a ocorrência de fecundação, e é tratada aqui como sinônimo de agamospermia (KOLTUNOW, 1993). O desenvolvimento de sementes nas Angiospermas ocorre, predominantemente, via reprodução sexuada, com a formação de estruturas sexuais na flor e ocorrência de dupla fecundação no saco embrionário para o desenvolvimento do embrião e do endosperma (KOLTUNOW, 2011). Estudos recentes têm mostrado que processos assexuados podem ser mais comuns do que se esperava em alguns grupos de angiospermas (CARMAN, 1997). No Cerrado Brasileiro, por exemplo, há predominância da reprodução sexuada por xenogamia (OLIVEIRA; GIBBS, 2000), mas a presença da poliembrião e em muitos casos da poliploidia em espécies deste bioma muitas vezes está associada à apomixia (SALOMÃO; ALLEM 2001; MENDES-RODRIGUES 2005, 2012; SAMPAIO, 2010; FIRETTI-LEGGIERI et al., 2013), fenômeno que pode trazer consequências ecológicas, genéticas e evolutivas importantes (PAUN et al., 2006; HÖRANDL, 2010).

1.1 Reprodução nas plantas

As Angiospermas têm se adaptado para as diferentes formas de reprodução ao longo do tempo. Os sistemas reprodutivos raramente são exclusivos e sistemas mistos, com ocorrência simultânea da autofertilização e da fertilização cruzada, podem ser frequentemente encontrados (KOLTUNOW, 1993).

O sistema reprodutivo influencia diretamente a variação genética nas populações (HAMRICK; GODT, 1989). Em populações autógamas é encontrado um alto nível de homozigose, sendo que a variabilidade dentro das populações pode ser baixa, pois novas mutações são eliminadas mais rapidamente do que nas populações alógamas, diminuindo a capacidade de responder a alterações ambientais (KARASAWA, 2009). Em apomíticos, a progênie pode ser geneticamente idêntica à planta mãe (KOLTUNOW, 1993;

RICHARDS, 2003), mantendo alta heterozigosidade com genótipos bem adaptados ao ambiente de origem (KOLTUNOW, 1993; RICHARDS, 2003; LEHTONEN et al. 2012).

A formação de um embrião assexual é proveniente apenas do tecido materno, diferentemente, do embrião sexual resultante da recombinação dos gametas masculinos e femininos (KOLTUNOW, 1993). Apesar disso, a apomixia acumula algumas vantagens como o sucesso reprodutivo de apomíticos que não necessitam de fertilização para formação da semente, mesmo na ausência de polinizadores em condições climáticas extremas; a reprodução clonal via semente; os recursos maternos são gastos, diretamente, para formação da progênie com 100% do seu genótipo adaptado; algumas plantas apomíticas conseguem evitar gastos com a produção de pólen e a fixação e disseminação de genótipos adaptados (RICHARDS, 1997 *apud* KARASAWA, 2009).

A apomixia pode ser obrigatória quando não há possibilidade de reprodução sexual ou facultativa quando este fenômeno ocorre eventualmente (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; RICHARDS, 2003). Em populações com reprodução mista, os eventos sexuais e assexuais são mantidos quando os custos de cada mecanismo flutuam ao longo dos anos (RICHARDS, 2003). Estudos nas últimas décadas têm mostrado que apomixia obrigatória é rara e que sistemas mistos podem explicar a variabilidade genética encontrada em populações apomíticas, com a possibilidade de gerar embriões sexuais e apomíticos (KOLTUNOW, 1993).

A reprodução sexual pode gerar variabilidade por meio da recombinação, segregação e fusão sexual e pode promover a migração gênica pela troca e incorporação de genes (RICHARDS, 1997 *apud* KARASAWA, 2009). Apesar disso, teorias sobre o custo efetivo do sexo estimam que a reprodução sexual possa ser duas vezes mais cara que a reprodução assexual, devido à diluição do genoma e a produção de estruturas masculinas (LEHTONEN et al. 2012).

A diluição do genoma se refere à produção de uma progênie assexual com 100% dos genes mantidos da planta mãe, enquanto que o genoma da progênie sexual acumula apenas 50% e a representação da mãe é diluída a

cada geração. Os recursos gastos para a produção masculina nem sempre são convertidos para produção de descendentes, pois apenas a mãe investe seus recursos diretamente para produzir seus descendentes. Apesar dessas teorias, medir o custo real do sexo envolve vários fatores e depende do contexto que será avaliado (LEHTONEN et al. 2012).

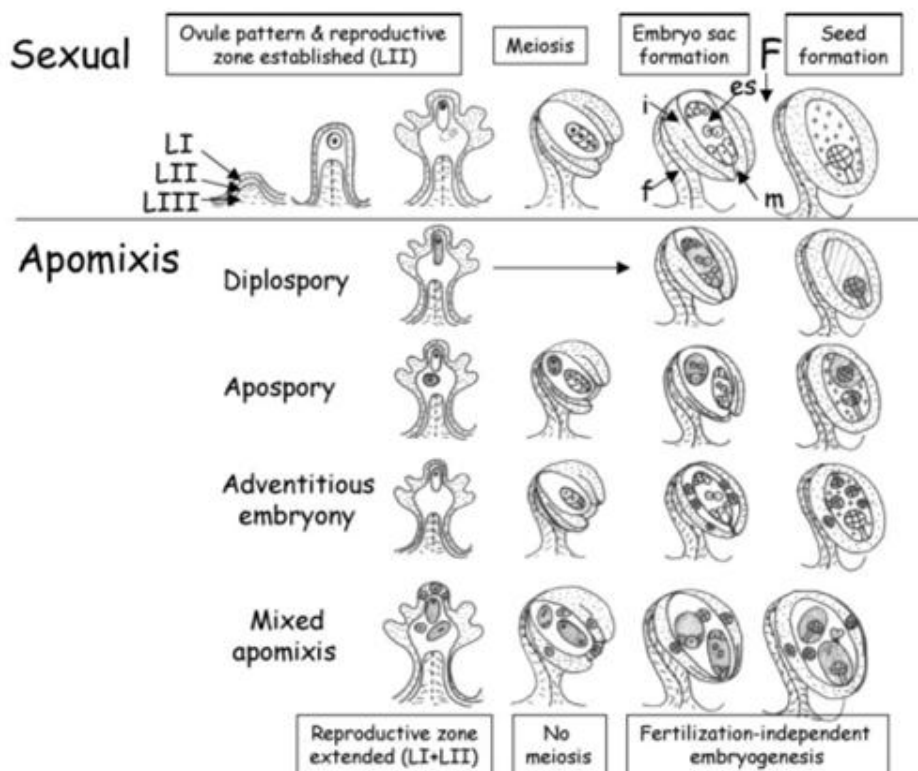


Figura 1. Esquema representando as etapas da reprodução sexual e apomítica ocorrentes em óvulos e sementes. Fonte: KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003.

1.1.1 Apomixia

A apomixia pode surgir a partir de uma desregulação do processo sexual na gametogênese e embriogênese, causado por eventos de hibridação entre espécies que diferem no tempo de desenvolvimento dos estágios iniciais do saco embrionário ou da formação do endosperma (CARMAN, 1997; KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003). Geralmente, a maioria dos apomíticos é poliplóide (CARMAN, 1997), o que possibilita o pareamento dos cromossomos e a manutenção desta desregulação do sistema sexual e da apomixia por várias gerações (KOLTUNOW, 1993; CARMAN, 1997, 2007).

Os mecanismos essenciais da apomixia evitam a meiose reducional, levam ao desenvolvimento de óvulos não-fertilizados, impedimento da fusão gamética e ao desenvolvimento independente do endosperma (RICHARDS, 2003). A apomixia pode ser subdividida em dois tipos gerais que se distinguem pela origem dos embriões assexuais: a apomixia gametofítica quando o embrião é originado de um gametófito e a esporofítica quando o embrião é originado do tecido do esporófito (KOLTUNOW, 1993; MENDES-RODRIGUES, 2010), apesar desta classificação geral subestimar a maior complexidade dos mecanismos de apomixia presentes nas plantas (MOOGIE, 1992).

Na apomixia gametofítica, há formação de embriões por meio de células não reduzidas do saco embrionário. Pode ser subdividida, de acordo com a célula que dá origem ao saco embrionário, em diplosporia, onde o saco embrionário não reduzido é formado a partir de uma célula mãe de megásporo e aposporia quando o saco embrionário vem de outras células do tecido esporogênico (Figura 1) (KOLTUNOW, 1993; KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; MENDES-RODRIGUES, 2010). Em ambos os casos o embrião se forma autonomamente a partir de uma célula desse saco embrionário assexuado.

A apomixia esporofítica ou embrionia adventícia ocorre quando há a formação de embriões diretamente a partir de células somáticas do tegumento ou do nucelo, tecido do esporófito (Figura 1) (KOLTUNOW, 1993; KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; MENDES-RODRIGUES, 2010). Esse parece ser o tipo de apomixia mais comum entre as Angiospermas, especialmente em ambientes tropicais (CARMAN, 1997).

A formação de embriões adventícios requer um endosperma funcional que raramente ocorre sem fertilização (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003). Pode ocorrer à formação de embriões zigóticos por meio sexual e embriões adventícios por partenogênese, produzindo uma semente poliembriônica com embriões originados de formas distintas (CARMAN, 1997; MENDES-RODRIGUES et al., 2005). Esses embriões apresentam tempo de desenvolvimento e maturação diferentes, mas o embrião zigótico e os apomíticos são semelhantes morfológicamente quando maduros (MENDES-RODRIGUES et al., 2005).

1.1.2 Poliembrionia e poliploidia em apomíticos

O mecanismo de formação da apomixia esporofítica e em alguns casos na gametofítica (aposporia) explica a presença de poliembrionia. A poliembrionia foi classificada por Mendes-Rodrigues (2010) conforme a origem do embrião, podendo ser poliembrionia biparental quando os embriões são formados sexualmente, uniparental quando os embriões são clones advindos do tecido materno ou mista quando apresentam os dois mecanismos.

Uma das desvantagens da poliembrionia é a competição por nutrição entre os embriões, levando a diminuição no peso e consequentemente, no tamanho das plântulas, podendo dificultar o estabelecimento. Dentre as vantagens, pode ocorrer um aumento das chances de sucesso de pelo menos um embrião; a presença de muitos embriões pode compensar a eventual produção de poucas sementes e plântulas que se desenvolvem em grupo podem ter mais sucesso reprodutivo (MENDES-RODRIGUES, 2010).

A apomixia gametofítica é comumente associada com a poliploidia em ambientes temperados (HÖRANDL, 2010). Alguns estudos feitos com espécies que apresentam apomixia esporofítica e poliembrionia também confirmam esta relação (OLIVEIRA et al.1992; MENDES-RODRIGUES et al. 2005; SAMPAIO, 2010) e a relação entre poliploidia e poliembrionia (MENDES-RODRIGUES et al. 2012). A poliploidia é a presença de mais de dois conjuntos cromossômicos em uma célula (STEBBINS, 1971). Estudos demonstram que é um fenômeno frequente e importante na evolução das plantas (SOLTIS et al., 2009), por ser uma forma rápida de adaptação e especiação (RAMSEY; SCHEMSKE, 1998). Há controvérsia a respeito da quantidade real de espécies de Angiospermas que são poliplóides, mas a maioria dos estudos estimam cerca de 30% a 70% das espécies são poliplóides ou se originaram de eventos de poliploidia (STEBBINS, 1950; MASTERSON, 1994).

1.1.3 Fatores genéticos e consequências populacionais da apomixia.

O estudo genético da apomixia abrange a potencialidade do seu uso para a agricultura sendo necessário entender como esta característica é controlada e determinada geneticamente (HANNA; BASHAW,1987) e as possíveis consequências na estrutura genética de populações apomíticas em

espécies selvagens e cultivadas (RICHARDS, 1996; PAUN et al., 2006; MAJESKY et al., 2012; BRESSAN et al., 2013) .

Uma das vantagens do uso da apomixia para a agricultura é que genes relacionados à apomixia poderiam ser introduzidos em plantas cultivadas a fim de fixar características de resistência a doenças e estresse em progênies, por várias gerações, por meio de sementes geneticamente modificadas evitando a erosão genética (HANNA; BASHAW, 1987; RICHARDS, 2003). A apomixia pode surgir a partir de mutações em um ou poucos loci ou por mudanças epigenéticas como resultado de hibridização e poliploidização (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003), e estes *loci* podem estar envolvidos diretamente com o processo de reprodução sexual (KOLTUNOW, et al., 2011).

A variabilidade genética está sendo estudada em espécies apomíticas, invasoras, nativas, cultivadas, pioneiras ou com mosaico reprodutivo, sendo que a maioria apresenta variabilidade genética maior entre do que dentro das populações (BIRMETA et al., 2002; MARTINS; OLIVEIRA, 2003; BARCACCIA et al., 2006; HÖRANDL, 2010). Níveis altos de diversidade são encontrados em plantas invasoras que apresentam um sistema reprodutivo misto, com eventos de reprodução sexuada e assexuada (PAPPERT et al., 2000). Estudos têm mostrado que há variabilidade genética em indivíduos apomíticos (PAUN et al., 2006), sendo que em espécies onde a apomixia é facultativa, a variabilidade genética populacional é proporcional à quantidade de plântulas com origem sexual (RICHARDS, 2003).

Ellstrand e Roose (1987) analisaram a diversidade genética em mais de 20 espécies de Angiospermas com reprodução clonal, tanto por propagação vegetativa, quanto por agamospermia. Apenas duas espécies não apresentaram variabilidade intraespecífica enquanto algumas espécies apresentaram populações multiclonais com diferentes níveis de diversidade genética. Em alguns apomíticos diplospóricos a meiose é incompleta, mas ocorre formação de quiasmas e recombinação (OZIAS-AKINS; van DIJK, 2007) mesmo que depois não ocorra a redução ou haja a recuperação dos números cromossômicos diplóides e a formação agamospérmica de embriões (e.g. CAETANO et al. 2013), nesses casos poderia ocorrer um aumento da variabilidade genética.

A forma de vida, o sistema reprodutivo, o modo de dispersão das sementes e a distribuição geográfica são fatores que também influenciam diretamente a diversidade genética (HAMRICK; GODT, 1989,1996; NYBOM; BARTISH, 2000). Táxons auto-férteis possuem menor diversidade intrapopulacional e maior diferenciação interpopulacional, enquanto os táxons com reprodução mista e cruzada apresentam os maiores índices de diversidade intrapopulacional (HAMRICK; GODT, 1989, 1996; NYBOM; BARTISH, 2000, NYBOM, 2004). Espécies que apresentam sementes com maior capacidade de dispersão, feita pelo vento ou por animais, possuem índices de diversidade interpopulacional menores, quando comparada com a dispersão por gravidade, por exemplo (HAMRICK; GODT, 1989). A diversidade genética também aumenta à medida que aumenta a distância geográfica entre as populações (NYBOM; BARTISH, 2000, NYBOM, 2004).

1.1.4 Distribuição de apomíticos

A história evolutiva e biogeográfica de táxons sexuais e apomíticos tem importante impacto na distribuição geográfica e deve ser estudada caso a caso (HÖRANDL et al., 2008). A apomixia é frequente em ambientes temperados, que sofreram influência de glaciações no Pleistoceno e uma das explicações para tal ocorrência é que as flutuações climáticas associadas a esses ambientes possibilitaram eventos de poliploidização e hibridização gerando uma rápida expansão de populações apomíticas reprodutivamente autônomas, fenômeno denominado partenogênese geográfica (CARMAN, 1997; HÖRANDL, 2006). A poliploidização e hibridização foram fenômenos importantes para a criação de uma diversidade genética inicial e surgimento de novos genomas (HÖRANDL, 2006). Em colonizações de novas áreas, linhagens apomíticas podem se dispersar mais rapidamente do que os seus parentes sexuais devido à reprodução uniparental (HÖRANDL, 2006; PAUN et al., 2006).

Estudos desenvolvidos em ambientes tropicais também têm indicado a ocorrência de apomixia (KAUR et al, 1978; MENDES-RODRIGUES, 2010; SAMPAIO, 2010) e mudanças ambientais paleoclimáticas ou atuais poderiam explicar a importância destes mecanismos nestes ambientes (ALLEM, 2003).

No Bioma Cerrado, a alta frequência de poliembrião está muitas vezes associada com a apomixia (SALOMÃO; ALLEM 2001; MENDES-RODRIGUES et al., 2005, 2010; SAMPAIO, 2010) sendo confirmada a presença em diversos táxons (MENDES-RODRIGUES, 2005, 2010; SAMPAIO, 2010). Aparentemente, existem algumas diferenças na origem e mecanismos da apomixia em plantas de ambientes tropicais e temperados.

A associação de poliploidia com a presença da apomixia promove o desenvolvimento de novas funções e combinações gênicas, dando mais flexibilidade ecológica e fisiológica ao poliplóide. Sendo assim, a poliploidia é considerada a responsável pelo grande sucesso da distribuição de alguns grupos apomíticos (BIERZCHUDEK, 1985).

As estimativas da frequência deste modo de reprodução assexual variam, mas Carman (1997) já demonstrava a existência deste fenômeno em 400 taxa e 40 famílias de Angiospermas. A distribuição deste fenômeno não ocorre de forma randômica, sendo predominante em certas famílias como Poaceae, Rosaceae, Asteraceae, Melastomataceae, Bignoniaceae e Malvaceae, nesta última mais especificamente na subfamília Bombacoideae (RICHARDS, 2003; BICKNELL; KOLTUNOW, 2004; HÖRANDL, 2006; MENDES-RODRIGUES, 2005, 2012; SAMPAIO, 2010).

1.2 Sistema de estudo: Malvaceae (subfamília: Bombacoideae; *Eriotheca*).

A família Malvaceae s.l. compreende nove subfamílias e caracteriza-se por um nectário constituído de tricomas glandulares, situado internamente na base do cálice ou, ocasionalmente, nas pétalas e no androginóforo (JUDD; MANCHESTER, 1997; BAYER et al., 1999; ALVERSON et al., 1999). A subfamília Bombacoideae juntamente com Malvoideae formam um clado monofilético denominado Malvatheca (ALVERSON, 1999; BAUM et al., 2004; DUARTE et al., 2011) caracterizado morfologicamente por espécies com anteras bi ou poliesporangiadas (DUARTE, 2010).

Bombacoideae se distingue das demais subfamílias por ter espécies arbóreas tropicais e por possuir cromossomos pequenos e numerosos (BAUM; OGINUMA, 1994). Essa subfamília, tradicionalmente tratada independentemente como a família Bombacaceae, possui distribuição

panropical, com 30 gêneros e 290 espécies distribuídas na América, África, Ásia e Oceania. No Brasil ocorrem 14 gêneros e 120 espécies, amplamente distribuídas (DUARTE, 2010).

Eriotheca é um pequeno gênero da subfamília Bombacoideae, possui 24 espécies distribuídas na América do Sul e 16 no Brasil, distribuídas na Floresta Atlântica, Amazônia e no Cerrado (DUARTE et al., 2011; SIMON; PENNINGTON, 2012). Análises moleculares recentes indicam que o gênero é parafilético, pertencente ao clado *Pachira* (Figura 3) (DUARTE et al., 2011). Algumas espécies possuem distribuição restrita, como *E. gracilipes*, ocorrente no Cerrado e em áreas de floresta estacional semidecidual, *E. pubescens*, restrita a áreas de cerrado, enquanto outras são restritas a uma determinada região como *E. pentaphylla* restrita ao estado de São Paulo (DUARTE, 2006) e *E. bahiense*, conhecida até então apenas no estado da Bahia (DUARTE et al., 2011).

Em geral, as flores de *Eriotheca* são formadas por cinco pétalas livres entre si, parcialmente aderidas ao tubo estaminal e com coloração, geralmente, clara (DUARTE, 2010). A variação morfológica floral presente entre as espécies de *Eriotheca* é uma característica determinante nas relações filogenéticas (DUARTE et al., 2011). A morfologia floral de *E. gracilipes* e *E. pubescens* é semelhante, com diferenças no tamanho, na coloração do cálice e na presença ou ausência de nectários extraflorais (OLIVEIRA et al., 1992).

A quantidade média de pólen encontrada em *E. gracilipes* é mais do que o dobro da quantidade encontrada em *E. pubescens* (OLIVEIRA et al., 1992). Os grãos de pólen de *Eriotheca* possuem tamanho uniforme e são predominantemente triangulares (SABA, 2007).

A autoincompatibilidade de ação tardia, frequentemente encontrada na subfamília Bombacoideae, representa uma barreira à autofertilização nas Angiospermas que apresentam flores hermafroditas (SEAVEY; BAWA, 1986). Algumas espécies do gênero *Eriotheca*, como *E. gracilipes* (OLIVEIRA et al., 1992) e *E. candolleana* (GOMES, 1997), apresentam incompatibilidade de ação tardia (LSI), em que a interrupção do tubo polínico próprio ocorre tardiamente, apenas quando este atinge o ovário (SEAVEY; BAWA, 1986), o que é característica de muitas plantas estudadas no grupo (GIBBS, 1988) e de

árvores tropicais de uma maneira geral (SEAVEY; BAWA, 1986, ALLEN; HISCOCK, 2008).

Para *E. pubescens* foram descritas populações autocompatíveis e poliembrionicas (OLIVEIRA et al., 1992), caracterizadas como apomíticas e pseudogâmicas a partir de estudos histológicos (MENDES-RODRIGUES et al., 2005). Para essa espécie, até o momento, apenas uma população autoincompatível e monoembrionica foi documentada (MENDES-RODRIGUES, 2010; MENDES-RODRIGUES et al., 2011). Em contraste, apesar da autoincompatibilidade e monoembrionia serem predominantes nas populações de *E. gracilipes*, a poliembrionia e, possivelmente, apomixia foram documentadas para alguns indivíduos da espécie (MENDES-RODRIGUES, 2010). A ocorrência de apomixia nestes grupos parece estar associada à poliploidia, fenômeno comum entre as espécies do Cerrado (MORAWETZ, 1986; OLIVEIRA et al., 1992; MENDES-RODRIGUES et al., 2005, 2010).

O Cerrado, bioma onde são encontradas essas espécies, é constituído de áreas de savanas, que ocupam o Brasil central, sendo o segundo maior bioma da América do Sul. É classificado como um *hot spot*, restando menos de 20% de sua vegetação original devido às ameaças econômicas a sua grande biodiversidade (MYERS et al., 2000). No Cerrado, ocorre uma ampla diversidade de plantas (RATTER et al., 1997) e parece ter ocorrido um intenso processo de especiação, comumente associado à variação do número cromossômico (FORNI-MARTINS; MARTINS, 2000). A maior parte das plantas lenhosas nesta região é autoincompatível e os processos de poliploidia e apomixia podem levar a consequências ecológicas e evolutivas importantes (ALLEM, 2003).

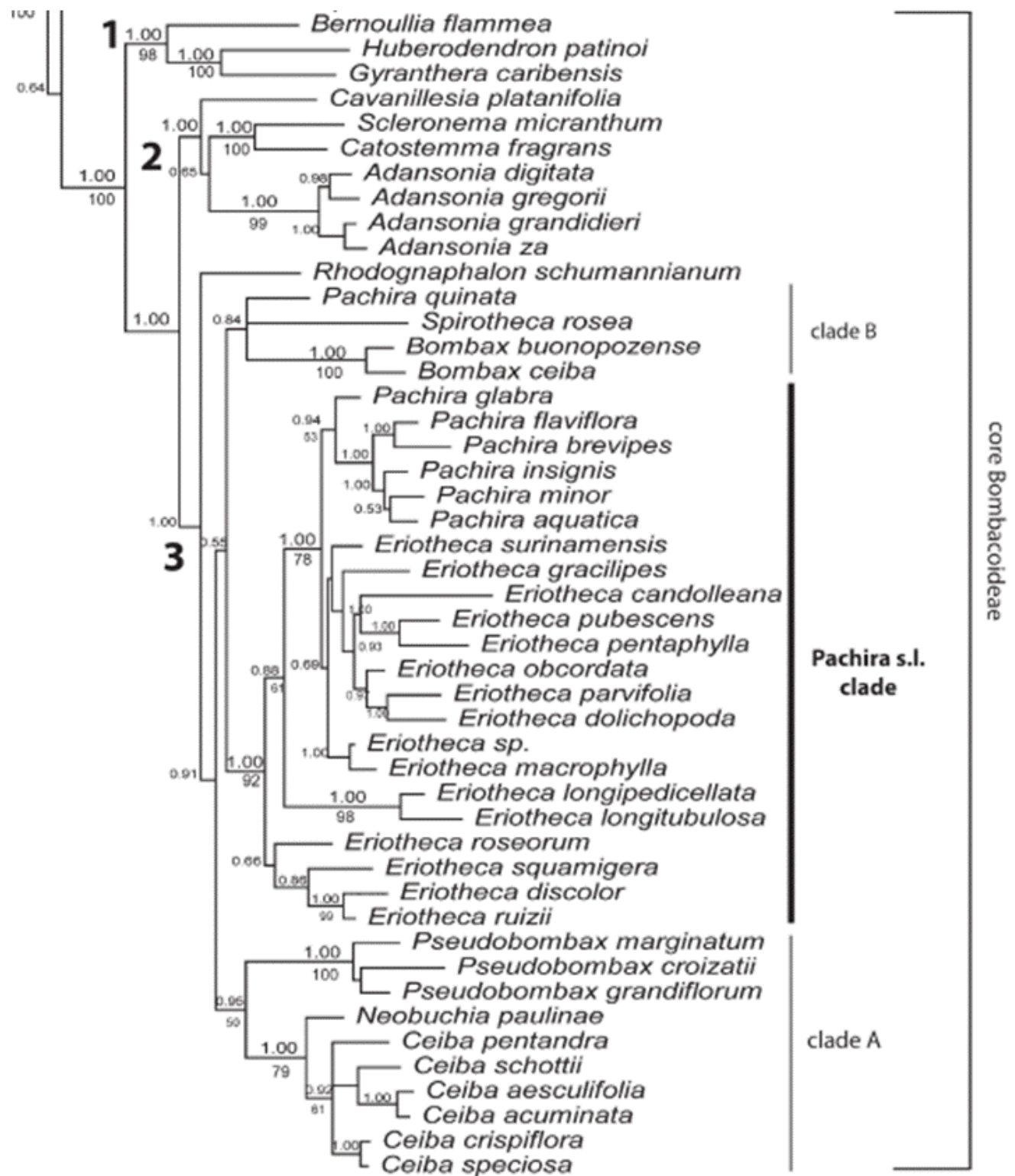


Figura 2. Filograma de combinação dos dados de ITS, *trnLF* e *matK* para o core Bombacoideae. Fonte: Duarte et al., 2011.

1.3 Estudos da ploidia e variação genética em plantas.

O número cromossômico é um parâmetro simples de análise do genoma, podendo ser utilizado na sistemática e na evolução das plantas para detectar a poliploidia e mudanças no genoma nem sempre visíveis por outras abordagens (GUERRA, 2008). A análise do número cromossômico torna-se complicada quando é elevado e na presença de diversidade citotípica. Assim, ferramentas alternativas são necessárias para estudos populacionais mais amplos, em escala regional.

Sabe-se que o aumento do tamanho celular é uma consequência da poliploidia (MIZUKAMI, 2001). Estudos têm mostrado que o nível de ploidia pode estar relacionado com o aumento médio do tamanho do grão de pólen e do estômato (PRZYWARA et al., 1988; ALTMANN et al., 1994; MASTERSON, 1994; MISHRA, 1997). Tate e Simpson (2004) demonstraram que em algumas espécies do gênero *Tarasa* acontece o contrário, onde espécies poliplóides possuem grão de pólen menor do que as diplóides, por isso há necessidade de comparar tal relação em cada táxon, a fim de verificar se é possível estabelecer essas associações.

A variabilidade genética é também uma característica importante para ser analisada em plantas que apresentam um sistema reprodutivo alternativo, visto as consequências genéticas que estas alterações podem causar (VALLEJO-MARÍN et al., 2010). Portanto, marcadores moleculares podem ser usados para avaliar a diversidade genética em populações de plantas e para correlacionar tal diversidade com os diferentes níveis de ploidia em sistemas de reprodução (SOUZA, 2008; BALAO et al., 2009).

O marcador molecular RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) foi utilizado em estudo de diversidade genética em duas espécies de *Eriotheca*, demonstrando diferenças entre espécies sexuais e apomíticas (MARTINS; OLIVEIRA, 2003), mas esse marcador possui baixa reprodutibilidade (REDDY et al., 2002), por isso estudos mais recentes estão utilizando outros marcadores mais reprodutíveis. Neste contexto, o uso de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeated*) torna-se viável por que, assim como o RAPD não exige conhecimento prévio do genoma, mas com a vantagem de

possuir alta reprodutibilidade e amplificar regiões de alto polimorfismo (GUPTA et al., 1994; REDDY et al., 2002). As regiões de ancoragem dos primers ISSR são encontradas nos eucariotos e demonstram alto polimorfismo sendo por isso, aplicados em estudos de genética de populações (ESSELMAN et al., 1999).

Estes marcadores podem ser usados em estudos de diversidade genética, marcação genética, mapeamento genético e biologia evolutiva em culturas vegetais. A amplificação de segmentos do DNA, utilizando marcadores ISSR, ocorre entre duas regiões microssatélites repetidas e idênticas orientadas em direções opostas (REDDY et al., 2002). Os primers são únicos, ancorados na extremidade 5' ou 3' da fita de DNA, apresentam de 16 a 25 pares de base permitindo alta temperatura de anelamento e a reprodutibilidade da técnica, sendo que o tamanho dos fragmentos amplificados varia entre 200-2000 pares de base. (WOLFE et al., 1998; REDDY et al., 2002). Trata-se de um marcador dominante que segue a herança Mendeliana simples (GUPTA et al., 1994) e os alelos são analisados com base na ausência e presença das bandas resolvidas em gel de agarose.

1.4 Hipóteses e objetivos

- A primeira hipótese desse trabalho é que a presença de mosaico reprodutivo possa interferir na variabilidade genética das populações. Populações apomíticas, provavelmente, mantêm alta heterozigosidade e apresentam maior variabilidade genética entre as populações, o que pode levar a uma diferenciação entre elas, podendo induzir a um processo de especiação. Por isso, o primeiro objetivo deste trabalho é comparar a variabilidade genética em populações assexuadas e sexuadas de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens* ocorrentes no Cerrado brasileiro.

- A segunda hipótese é que o aumento da ploidia leva a um aumento do tamanho celular e que utilizando a morfometria das estruturas selecionadas haverá diferenças marcadas entre os níveis de ploidia. Por isso, o segundo objetivo é avaliar o uso de medidas do tamanho do grão de pólen e do

estômato em *E. gracilipes* e *E. pubescens* como estimadores da ploidia em populações com citótipos diferentes.

- A terceira hipótese deste trabalho é que os números cromossômicos da sub-família Bombacoideae são distintamente altos em relação aos outros grupos incluídos na família Malvaceae, demonstrando a importância evolutiva de tal característica para este táxon. Por isso, o terceiro objetivo é analisar o número cromossômico de espécies de Malvaceae, a fim de verificar se a evolução do número cromossômico está refletida na filogenia dessa família.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEM , A. C. Optimization theory in plant evolution: An overview of long-term evolutionary prospects in the Angiosperms. **Botanical Review**, v.69, p. 225 – 251, 2003.

ALLEN, A.C.; HISCOCK, S.J. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. In:V.E. Franklin-Tong (ed.).**Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms**, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008, 314pp.

ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhf* sequence data. **American Journal of Botany**, v.10, p. 1474-1486, 1999.

ALTMANN, T.; DAMM, B.; FROMMER, W.B.; MARTIN, T.; MORRIS, P.C.; SCHWEIZER, D.; WILLMITZER, L.; SCHMIDT, R. Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. **Plant Cell Reports**, v.13, p.652-656, 1994.

BARCACCIA, G.; ARZENTON, F; SHARBEL, TF; VAROTTO, S.; PARRINI, P.; LUCCHIN, M. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomict *Hypericum perforatum* L. **Heredity**, v.96, p. 322–334, 2006.

BALAO, F.; CASIMIRO-SORIGUER, R.; TALAVERA, M.; HERRERA, J.; TALAVERA, S. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. **Annals of Botany**, v. 104, n. 5, p. 965-73, 2009.

BAUM, D. A.; OGINUMA, K. A Review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts for *Adansonia*. **Taxon**, v. 43, n. 1, p. 11–20, 1994.

BAUM, D. A.; SMITH, S. D. W.; YEN, A.; ALVERSSON, W.S.; NYFFELER, R.; WHITLOCK, B.A.; OLDHAM, R.L. Phylogenetic relationships of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid

DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1863–1871, 2004.

BAYER, C.; FAY, M.F.; DE BRUIJN, A.Y.; SAVOLAINEN, V.; MORTON, C.M.; KUBITZKI, K.; ALVERSON, W.S.; CHASE, M.W. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.129, p. 267-303, 1999.

BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrum. **The Plant Cell**, v.16, p.228–245, 2004.

BIERZCHUDEK, P. Patterns in plant pathogenesis. **Experientia**, v. 41, p. 1255-1264, 1985.

BIRMETA, G.; NYBOM, H.; ENDASHAW, B. RAPD analysis of genetic diversity among clones of the Ethiopian crop plant *Ensete ventricosum*. **Euphytica**, v.124, p. 315–325, 2002.

BRESSAN, E. A.; SEBBENN, A. M.; FERREIRA, R. R.; LEE, T. S. G.; FIGUEIRA, A. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. **Tree Genetics & Genomes**, v.10 p.1-9, 2013.

CAETANO, A.N.S.; SIMÃO, D.G.; CARMO-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, P.E. Diplospory and obligate apomixis in *Miconia albicans* (Miconieae, Melastomataceae) and an embryological comparison with its sexual congener *M. chamissois*. **Plant Systematic and Evolution**, v.299, p. 1-10, 2013.

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

CARMAN, J.G. Do duplicate genes cause apomixis? In: HÖRANDL, E.; Grossniklaus, U.; van Dijk, P.; Sharbel, T. (eds) Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives. Gantner, Ruggell, p.169–194, 2007.

DUARTE, M. C. **Diversidade de Bombacaceae Kunth no Estado de São Paulo**. 99 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2006.

DUARTE, M. C. **Análise filogenética de *Eriotheca* Schott & Endl . e gêneros afins (Bombacoideae , Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil São Paulo**, Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

DUARTE, M. C.; ESTEVES, G. L.; SALATINO, M. L. F.; WALSH, K. C.; BAUM, D. A. Phylogenetic Analyses of *Eriotheca* and Related Genera (Bombacoideae, Malvaceae). **Systematic Botany**, v. 36, n. 3, p. 690–701, 2011.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology** v,8, p. 443-451, 1999.

ELLSTRAND,N.C.; ROOSE, M. L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. **American Journal of Botany**, v.74, p. 123–131, 1987.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; LOHMANN, L.G.; ALCANTRA, S.; COSTA, I.R.; SEMIR, J. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae , Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 35, p. 43-53, 2013.

FORNI-MARTINS, E. R.; MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 947–955, 2000.

GIBBS, P.E.; SEMIR, J.; CRUZ, N.D. The proposal to unite the genera *Chorisia* Kunth and *Ceiba* Miller (Bombacaceae). **Notes Royal Botanical Garden Edinburgh**, v.45, p.125-136, 1988.

GREEN, R.F.; NOAKES, D.L.G. Is a little bit of sex as good as a lot? **Journal of Theoretical Biology**, v.174, p.87–96, 1995.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p. 339–50, 2008.

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-seVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.

HANNA, W.W.; BASHAW, E. C. Apomixis: Its identification and use in plant breeding. **Crop Science**, v. 27, p. 1136-1139, 1987.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M.; KAHLER, T. A. L.; WEIR, B. S. (eds.), p. 43-63. **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**, 1989.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant. **The Royal Society of London**, v. 351, p.1291–1298, 1996.

HÖRANDL, E. The complex causality of geographical parthnogenesis. **New Phytologist**, v. 171, p. 525-538, 2006.

HÖRANDL, E. The evolution of self-fertility in apomictic plants. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, p. 73-86, 2010.

HÖRANDL, E.; PAUN, O. Patterns and sources of genetic diversity in apomitic plants: implications for evolutionary potentials and ecology. *In* **Apomixis: Evolution, Mechanisms and Perspectives**. (HÖRANDL, E.; GROSSNIKLAUS, U.; SHARBEL, T.; van DIJK, P.eds.). Gantner Verlag, Ruggell, Liechtenstein, 2007, p. 169-194.

HÖRANDL, E.; COSENDAL, A.C.; TEMSCH, E.M. Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach. **Plant Ecology & Diversity**, v.1, p.309-320, 2008.

JUDD, W. S.; MANCHESTER, S. R. Circumscription of Malvaceae (Malvales) as determined by a preliminary cladistic analysis of morphological, anatomical, palynological, and chemical characters. **Brittonia**, v. 49, p. 384–405, 1997.

KAUR, A.; HA, C.O.; JONG, K.; SANDS, V.E.; CHAN, H.T.; SOEPADMO, E.; ASHTON, P.S. Apomixis may be widespread among trees of climax rain forest. **Nature**, v. 271, p. 440-442, 1978.

KARASAWA, M. M. G. Diversidade Reprodutiva de Plantas. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009, 113 p.

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

KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 547–74, 2003.

KOLTUNOW, A.M.G.; JOHNSON, S. D.; RODRIGUES, J. C. M.; OKADA, T.; HU, Y.; TSUCHIYA, T.; WILSON, S.; FLETCHER, P.; ITO, K.; SUZUKI, G.; MUKAI, Y.; FEHRER, J.; BICKNELL, R.A. Sexual reproduction is the default mode in apomictic *Hieracium* subgenus *Pilosella*, in which two dominant loci function to enable apomixis. **The Plant Journal**, v.66, p. 890–902, 2011.

LEHTONEN, J; JENNIONS, M. D.; KOKKO, H. The many costs of sex. **Trends in Ecology and Evolution**, v.27, p. 172-178, 2012.

MAJESKY, L.; VASUT, R.J.; KITNER, M.; TRÁVNÍČEK, B. The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. **Plos One**, v. 7, p.1-14, 2012.

MARTINS, R. L.; OLIVEIRA, P. E. RAPD Evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 338–340, 2003.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v. 264, n. 22, p. 421–423, 1994.

MENDES-RODRIGUES, C.; CARMO-OLIVEIRA, R.; TALAVERA, S.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L.; OLIVEIRA, P.E. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). **Plant Biology**, v. 7, n. 5, p. 533–40, 2005.

MENDES-RODRIGUES, C. **Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2010.

MENDES-RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, P. E. Polyembryony in Melastomataceae from Brazilian Cerrado : multiple embryos in a small world. **Plant Biology**, v. 14, p. 845-853, 2012.

MISHRA, M. K. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L . **Annals of Botany**, v. 80, p. 689-692, 1997.

MIZUKAMI, Y. A matter of size: developmental control of organ size in plants. **Plant Biology**, v.4, p.533–539, 2001.

MOGIE, M. The evolution of asexual reproduction in plants. London: Chapman & Hall, 1992, 276 p.

MORAWETZ, W. Remarks on kariological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematics and Evolution**. v. 152, p. 49-100, 1986.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-55, 2004.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, v.195, p.311-329, 2000.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BARBOSA, A.A.; TALAVERA, S. Contrasting breeding system in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian Cerrados. **Plant Systematics and Evolution**, v.179, p.207-219, 1992.

OZIAS-AKINS, P.; van DIJK, P.J. Mendelian genetics of apomixis in plants. **Annual Reviews of Genetics**, v.41, p.509–537, 2007.

PAPPERT, R. A.; HAMRICK, J. L.; DONOVAN, L. A. Genetic Variation In *Pueraria Lobata* (Fabaceae), An Introduced, Clonal, Invasive Plant Of The Southeastern United States. **American Journal of Botany**, v.9, p.1240–1245, 2000.

PAUN, O.; GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; HÖRANDL, E. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 4, p. 897–910, 2006.

PRZYWARA, L.; PANDEY, K.K.; SANDERS, P.M. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. **New Zealand Journal of Botany**, v. 26, p.179-182, 1988.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 467–501, 1998.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.120, p.9–16, 2002.

RICHARDS, A.J. Genetic variability in obligate apomicts of the genus *Taraxacum*. **Folia Geobotanica et Phytotaxonomica**, v.31, p. 405-414, 1996.

RICHARDS, A.J. Plant breeding. London: Chapman and Hall, 1997, 529p.

RICHARDS, A. J. Apomixis in flowering plants: an overview. **Philosophical transactions of the Royal Society of London, Biological sciences**, v. 358, n. 1434, p. 1085–93, 2003.

SABA, M.D. **Morfologia Polínica De Malvaceae: Implicações Taxonômicas E Filogenéticas**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal de Feira de Santana. Feira de Santana. 2007.

SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Polyembryony in Angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p. 369-378, 2001.

SAMPAIO, D.S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010.

SEAVEY, S. R.; BAWA, K. S. Late-acting self-incompatibility in angiosperms. **Botanical Review**, v.52, p. 195-219, 1986.

SIMON, M.F.; PENNINGTON, T. Evidence for adaptation to fire regimes in the Tropical Savannas of the Brazilian Cerrado. **International Journal of Plant Sciences**, v. 173, n. 6, p. 711–723, 2012.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; DePAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and Angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 336-348, 2009.

SOUZA, G. A.; RODRIGUES, M.C. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N.C.; OLIVEIRA, L.O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

STEBBINS, G. L. Variation and Evolution in Plants (Columbia Univ. Press, New York), 1950.

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

TATE, J.A.; SIMPSON, B.B. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 207–213, 2004.

VALLEJO-MARÍN, M.; DORKEN, M. E.; BARRETT, S. C. H. The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.41, p.193–213, 2010.

WOLFE, A.D.; XIANG, Q.Y.; KEPHART, S.R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, v.7, p.1107-1125, 1998.

CAPÍTULO 2

**MOSAICOS REPRODUTIVOS, PLOIDIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae).**

**MOSAICOS REPRODUTIVOS, PLOIDIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE
Eriotheca (Bombacoideae – Malvaceae).**

MARINHO, R.C.^{1*}; MENDES-RODRIGUES, C.²; BORBA, E.L.³;
BONETTI, A.M¹; OLIVEIRA, P.E.²

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia-MG, Brasil.

² Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG,
Brasil.

³ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC,
Santo André-SP, Brasil.

*Corresponding author: Rafaela Cabral Marinho
e-mail:rafaelacabralmarinho@hotmail.com

RESUMO

Alternativas reprodutivas resultam em mosaicos populacionais onde os processos assexuais podem ser obrigatórios ou não. A apomixia é a formação de sementes sem fertilização que pode ocorrer em alguns casos concomitantemente com a reprodução sexual. Essas alternativas reprodutivas parecem estar associadas a variações do número cromossômico em espécies de *Eriotheca* que ocorrem no Cerrado brasileiro. Populações poliembriônicas e apomíticas de *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae) são poliplóides ($2n=6x=276$) e a população monoembriônica é sexuada e tetraplóide ($2n=4x=184$). Populações monoembriônicas e sexuadas de *Eriotheca gracilipes* são diplóides ($2n=2x=92$) enquanto a população poliembriônica é poliplóide ($2n=6x=276$). Foram utilizados marcadores moleculares para entender as consequências genéticas dos processos sexuais e assexuais nesses grupos. Folhas de indivíduos dos dois padrões de embrionia de *E. gracilipes* e *E. pubescens* foram coletadas para extração de DNA e amplificação com primers ISSR. As amplificações geraram 111 fragmentos. As porcentagens de bandas polimórficas (P), o índice de Shannon (I) e a heterozigosidade esperada (He) variaram de 50,51% a 68,75%; 0,294 ($\pm 0,031$) a 0,396 ($\pm 0,034$) e 0,201 ($\pm 0,021$) a 0,273 ($\pm 0,024$) respectivamente. Em *E. gracilipes* a maior variabilidade foi encontrada entre as populações ($\phi_{st}=0,53$), ao contrário de *E. pubescens* onde maior variação foi encontrada dentro das populações ($\phi_{st}=0,47$). Os resultados obtidos nos dendogramas Neighbor-joining e na análise Bayesiana demonstraram uma separação entre as espécies e uma clara separação entre os padrões de ploidia dentro de cada espécie. Clones foram encontrados apenas em *E. pubescens*. Os estudos demonstraram que mesmo nas populações onde a reprodução assexuada parece ser persistente, há eventos de reprodução sexuada e recombinação genética que aumentam a variabilidade genética.

Palavras-chave: *Eriotheca*, sistemas de reprodução, apomíticos, variabilidade genética, conservação.

ABSTRACT

Alternative reproductive processes result in mosaics of populations where asexuality may be prevailing or not. Apomixis is the formation of seeds without fertilization can occur in some cases concurrently with sexual reproduction. These reproductive alternatives seem to be associated with changes in chromosome number in species of *Eriotheca* in Brazilian Cerrado. Populations of apomictic and polyembryonic *Eriotheca pubescens* (Malvaceae-Bombacoideae) are polyploid ($2n = 6x = 276$) and a monoembryonic population is sexual and tetraploid ($2n = 4x = 184$). Monoembryonic and sexual populations of *Eriotheca gracilipes* are diploid ($2n = 2x = 92$) while a poliembryonic population is polyploid ($2n = 6x = 276$). We used molecular markers to understand the genetic consequences of sexual and asexual processes in these groups. Leaves individuals of both embryonic patterns of *E. gracilipes* and *E. pubescens* were collected for DNA extraction and amplification with ISSR primers. Amplifications generated 111 fragments. The percentage of polymorphic bands (P), Shannon indices (I) and expected heterozygosity (He) ranged from 50.51% to 68.75%, $0.294 (\pm 0.031)$ to $0.396 (\pm 0.034)$ and $0.201 (\pm 0.021)$ to $0.273 (\pm 0.024)$ respectively. In *E. gracilipes* the greatest variability was found among populations ($\phi_{st} = 0.53$), whereas in *E. pubescens* greater variation was found within populations ($\phi_{st} = .47$). The results obtained from the Neighbor-joining dendrograms and the Bayesian analysis showed a clear species separation and separation between the ploidy patterns within of each species. Clones were found only in *E. pubescens*. Data here supports other studies where even in populations with prevalent asexual reproduction, there are events of mating and recombination to increase the genetic variability.

Keywords: *Eriotheca*, breeding systems, apomictic, genetic variability, conservation.

Introdução

A reprodução das angiospermas é variada (BICKNELL; KOLTUNOW, 2004), com predominância da reprodução sexuada que envolve mecanismos de autoesterilidade resultando em populações muito variadas geneticamente (BICKNELL; KOLTUNOW, 2004). A apomixia é a formação de sementes sem fecundação, podendo levar ao desenvolvimento de sacos embrionários não reduzidos, à interrupção da meiose reducional, desenvolvimento autônomo do embrião e, frequentemente, ao desenvolvimento independente do endosperma (RICHARDS, 2003). A apomixia pode ser subdividida em dois tipos gerais que se distinguem pela origem dos embriões assexuais: a apomixia gametofítica quando o embrião é originado de um gametófito e a esporofítica quando o embrião é originado do tecido do esporófito (KOLTUNOW, 1993; MENDES-RODRIGUES, 2010), apesar desta classificação geral subestimar a maior complexidade dos mecanismos de apomixia presentes nas plantas (MOOGIE, 1992). A apomixia esporofítica ou embrionia adventícia parece ser o tipo de apomixia mais comum entre as Angiospermas, principalmente, em ambientes tropicais (CARMAN, 1997).

Especialmente, na apomixia esporofítica, a formação de embriões adventícios requer um endosperma funcional que raramente é formado sem fertilização. Muito comumente, a formação dos embriões apomíticos depende da polinização e da fecundação dos núcleos polares, mecanismo conhecido como pseudogamia (KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003). Com isso, ocorre à formação de embriões zigóticos por meio sexual e de embriões adventícios por embrionia adventícia, resultando em uma semente poliembriônica com embriões originados por mecanismos distintos (CARMAN, 1997; MENDES-RODRIGUES et al., 2005).

As estimativas da frequência deste modo de reprodução assexual nas Angiospermas variam, mas Carman (1997) já demonstrava a existência deste fenômeno em 400 taxa e 40 famílias, sendo que Poaceae, Rosaceae e Asteraceae, são as famílias que mais apresentam apomixia (RICHARDS, 2003; KOLTUNOW; GROSSNIKLAUS, 2003; HÖRANDL, 2006).

A maioria dos apomíticos é poliplóide (CARMAN, 1997), sendo que a poliploidia pode promover o desenvolvimento de novas funções e combinações gênicas, dando mais flexibilidade ecológica e fisiológica ao apomítico. Sendo assim, a poliploidia é considerada a responsável pelo grande sucesso da distribuição de alguns grupos apomíticos (BIERZCHUDEK, 1985).

A poliploidia e a poliembrionia são fenômenos frequentemente encontrados em espécies do Cerrado, as savanas neotropicais do Brasil Central (MORAWETZ, 1986; FORNI-MARTINS; MARTINS, 2000; SALOMÃO; ALLEM 2001; SAMPAIO, 2010; MENDES-RODRIGUES; OLIVEIRA, 2012). A ocorrência da poliembrionia pode indicar a presença de apomixia em algumas plantas tropicais (CARMAN, 1997; MENDES-RODRIGUES, 2010; SAMPAIO, 2010). Tradicionalmente, a poliploidia ocorre em espécies que possuem apomixia gametofítica (HÖRANDL, 2010), no entanto, estudos também comprovam esta relação em espécies com apomixia esporofítica (MENDES-RODRIGUES, 2005; SAMPAIO, 2010; FIRETTI-LEGGIERI et al., 2013).

Estas diferenças reprodutivas são importantes para compreender o processo de diferenciação e evolução nas espécies vegetais e suas consequências ecológicas. Alguns estudos mostram a importância da apomixia para a estruturação genética de populações em espécies de plantas de ambientes temperados (PAUN et al., 2006; HÖRANDL, 2010), mas extensão e as consequências de tais alternativas reprodutivas em ambientes tropicais são ainda pouco estudadas.

Para avaliar como populações apomíticas e poliplóides do Cerrado se mantêm geneticamente frente às populações conespecíficas sexuais, foram escolhidas para este estudo duas espécies do gênero *Eriotheca*. *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl e *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns são encontradas no Cerrado do Brasil Central, sendo que a primeira apresenta apomixia esporofítica e é hexaplóide ($2n=6x=276$) (FORNI-MARTINS et al., 1995; MAGLIO et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1992, MENDES-RODRIGUES et al., 2005), com uma população restrita monoembriônica e tetraplóide ($2n=4x=184$) (MENDES-RODRIGUES, 2010). *Eriotheca gracilipes* é diplóide ($2n=2x=92$) com reprodução sexuada (MAGLIO et al., 1984; FORNI-MARTINS et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1992, MENDES-RODRIGUES et al.,

2005), porém foi encontrada uma população hexaplóide ($2n=6x=276$) e poliembriônica, que provavelmente, também apresenta apomixia esporofítica (MENDES-RODRIGUES, 2010).

O Cerrado, bioma o qual essas espécies são amplamente distribuídas, é o segundo maior bioma da América do Sul, classificado como um *hot spot* devido a sua grande biodiversidade, restando apenas 20% de sua vegetação original (MYERS et al., 2000). Desde a década de 70, está sendo rapidamente modificado e fragmentado devido às grandes áreas de plantações e pastoreio (RATTER et al., 1997). Portanto, estratégias de conservação devem ser traçadas, e estudos genéticos identificando a variabilidade genética de espécies do Cerrado brasileiro podem auxiliar na delimitação de áreas mais importantes de conservação (LACERDA, 2001).

Marcadores moleculares podem ser usados para mensurar a variabilidade genética em espécies próximas, populações ou em indivíduos (SOUZA, 2008), auxiliando na detecção de clones em populações apomíticas (MARTINS; OLIVEIRA, 2003). Em comparação com outros marcadores, o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeated*) é muito utilizado por ser um método simples, com alta reprodutibilidade (GUPTA et al., 1994; REDDY et al., 2002) e por não exigir conhecimento prévio do DNA (GUPTA et al., 1994). As regiões microsatélites de ancoragem dos primers ISSR são encontradas nos eucariotos e demonstram alto polimorfismo, sendo por isso aplicados em estudos de genética de populações (ESSELMAN et al., 1999).

O objetivo deste trabalho é comparar a variabilidade genética em populações assexuadas e sexuadas de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens* ocorrentes no Cerrado brasileiro, a fim de verificar se há diferenciação genética entre as populações com diferentes padrões de embrião, fenômeno esse que poderia levar a especiação nestas espécies.

Material e Métodos

Material Biológico

Foram coletadas folhas de indivíduos de *Eriotheca gracilipes* (n=36) e *E. pubescens* (n= 38) (Tabela 1) em áreas previamente estudadas quanto a ploidia e o sistema reprodutivo das populações (Figura 1) (MENDES-RODRIGUES, 2010). Devido à restrição da distribuição de alguns dos padrões de ploidia, foi coletada apenas uma população de cada citótipo de cada espécie. Imediatamente após a coleta, as folhas foram armazenadas em sílica gel até a extração do DNA genômico. As populações foram georeferenciadas utilizando medidas diretas de GPS (Tabela1)

Tabela 1. Locais de coleta, coordenadas geográficas e número amostral (N) das populações monoembriônicas ou poliembriônicas de *E.gracilipes* e *E. pubescens* amostradas.

Espécie/padrão	Código	Município	Coordenadas	N
<i>E. gracilipes</i> /monoembriônica	EGM	Uberlândia-MG	19°18'34"S/ 48°26'48.1"W	17
<i>E. gracilipes</i> /poliembriônica	EGP	Caldas Novas-GO	17°47'08"S/48°40'09"W	19
<i>E. pubescens</i> /monoembriônica	EPM	Cristalina-GO	16°52'31.8"S/47°40'44.4"W	19
<i>E. pubescens</i> /poliembriônica	EPP	Catalão-GO	18°08'42.0"S/47°54'23.5"W	19

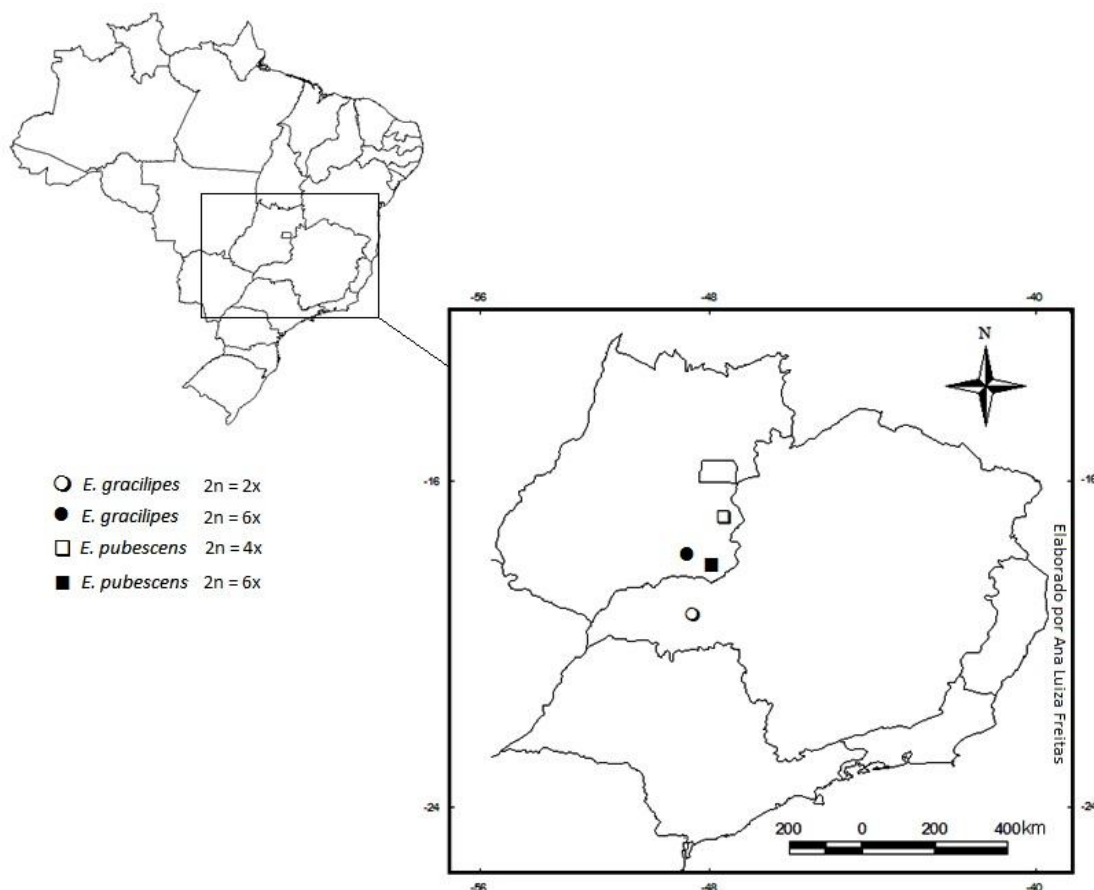


Figura 1. Mapa de distribuição das populações de *Eriotheca*.

Biologia Molecular

1. Extração do DNA genômico

Folhas das duas populações de *E. gracilipes* foram processadas para extração de DNA, seguindo o protocolo Doyle & Doyle (1987). Aproximadamente 50mg do material desidratado foi macerado e posteriormente, adicionado tampão de extração CTAB 2% (CTAB 2%, 1,4M NaCL, 100mM Tris-HCl pH 8,20mM EDTA pH 8 e 2,5 % PVP) e 2% de β -mercaptoetanol. Após a extração o DNA foi diluído em 130 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). As amostras *E. pubescens* apresentaram muita mucilagem, influenciando na qualidade do material extraído e para solucionar, foi utilizado o kit de extração DNeasy Plant (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante.

A qualidade e concentração do DNA foram verificadas em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. A concentração ideal do DNA para amplificação dos fragmentos ISSR foi determinada a partir de testes de diluição (1:10; 1:50; 1:100). A concentração foi testada para cada espécie em função da qualidade da amplificação, sendo que a diluição de 1:50 apresentou melhores resultados para ambas.

2. Amplificação dos fragmentos *ISSR* (*Inter simple sequence repeat*)

Dentre os 27 primers ISSR testados para as duas espécies, 10 foram escolhidos por gerarem a menor quantidade de bandas inespecíficas e maior quantidade de bandas polimórficas para as duas espécies. As temperaturas de anelamento dos primers foram otimizadas para cada loco *ISSR* (Tabela 2).

Tabela 2. Primers usados, sequências e temperatura de anelamento otimizada para a amplificação de loci ISSR de *Eriotheca*.

Primer	Sequência	Temperatura °C
AW3	(GA) ₇ RG	47,5°C
Becky	(GT) ₆ RG	47,5°C
JOHN	(AG) ₇ YC	47,5°C
MANNY	(CAC) ₄ RC	50,0°C
MAO	(CTC) ₄ RC	47,5°C
OMAR	(GAG) ₄ RC	47,5°C
UBC 840	(GA) ₈ YT	47,5°
UBC 827	(AC) ₈ G	47,5°C
UBC 880	(GGAGA) ₃	50,0°C
UBC 898	(CA) ₆ RY	50,0°C

Y= C ou T; R= A ou G

O volume final da solução de trabalho para cada reação foi de 19µL com: 2,0 µL de Tampão 10x, 0,21 mM de dNTP, 32 µM de primer, 1 unidade de Taq polimerase, 11µL de DNA diluído (1:50). As amplificações foram realizadas em termocicladores Gene Amp System 9700 (Applied Biosystems) e Arktik Thermal Cycler (Thermo Scientific). Para a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) as amostras foram submetidas à temperatura de 94°C por 4 minutos para

denaturação, seguida de 37 ciclos de amplificação: 94°C por 1 minuto para denaturação, 2 minutos para anelamento sendo que as temperaturas de anelamento variaram conforme o primer (Tabela 2), 72°C por 2 minutos para extensão e a extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com Brometo etídio (0,5 mg/mL) e imerso em TBE 0,5X (0,2M Tris base, 0,5M ácido bórico, 5mM EDTA), à tensão de 80 volts por 3 horas e fotografados sob luz ultravioleta em Transiluminador Image Quant 150 (GE Healthcare). Marcador molecular de 100pb (Ludwig) foi utilizado para acompanhar a separação eletroforética e estimar o tamanho dos fragmentos obtidos.

3. Análise dos dados

Os fragmentos obtidos por amplificação foram avaliados quanto à presença (1) e ausência (0), produzindo uma matriz binária. Bandas inespecíficas foram descartadas das análises. O programa GeneAlex 6.41 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi usado para obter os índices de diversidade, tais como a porcentagem de bandas polimórficas (P), Índice de Shannon (I) heterozigosidade esperada (H_e), distância genética não-enviesada de Nei e distância genética entre os indivíduos (GD). Com o mesmo programa foi realizada uma análise das coordenadas principais (PCO), para o qual foram utilizados os dados de distância genética e distância genética não-enviesada de Nei. O cálculo de Índice de Shannon, porcentagem de bandas polimórficas e heterozigosidade esperada foram feitos para cada espécie separadamente. Os demais cálculos foram feitos com matriz produzida a partir da união dos dados binários das quatro populações de *Eriothea*.

Uma primeira análise molecular de variância (AMOVA) foi feita com as quatro populações, diferenciando as espécies em dois grupos e utilizando os fragmentos presentes nas quatro populações, na segunda os padrões de embrionia foram diferenciados em dois grupos, o primeiro monoembriônico (EGM + EPM) e o segundo poliembriônico (EGP + EPP). A terceira AMOVA foi feita com as duas populações de *E. gracilipes* e a quarta com as duas populações de *E. pubescens*.

O programa AFLP-SURV (VEKEMANS et al., 2002) foi usado para gerar matrizes de dissimilaridade, considerando o método Bayesiano com 100 permutações e 1000 de bootstrap. Foram produzidas, no programa PHYLIP 3.69 (FELSENSTEIN, 2006), árvores de consenso neighbor-joining com os respectivos valores de bootstrap.

A análise Bayesiana de atribuição foi feita no programa STRUCTURE 2.2 (FALUSH et al., 2007) para determinação do número de grupos genéticos reais (K) e identificar padrões de estruturação genética nas espécies. A análise foi realizada considerando as quatro populações de *Eriotheca*. O número de grupos genéticos testados variou de $K=1$ até $K=6$, com 15 corridas independentes para cada K . Foram utilizadas 1.000.000 iterações de cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) com 100.000 iterações iniciais (burn-in). Foi adotado o modelo de *admixture model* e *correlated allele frequencies*. Para definição do melhor K foi utilizado o programa Harvest (EARL; VONHOLDT, 2012), no qual foram usados os resultados obtidos no Structure.

Resultados

Os dez primers ISSR selecionados para o estudo, geraram 111 fragmentos utilizados nas análises. Algumas análises de diversidade genética foram feitas, independentemente, para cada espécie utilizando 99 fragmentos para *E. gracilipes* e 80 fragmentos para *E. pubescens*. A porcentagem de bandas polimórficas (P), índice de Shannon (I) e a heterozigosidade esperada (H_e) variaram de 50,51% a 68,75%; 0,294 ($\pm 0,031$) a 0,396 ($\pm 0,034$) e 0,201 ($\pm 0,021$) a 0,273 ($\pm 0,024$), respectivamente (Tabela 3).

Uma primeira AMOVA foi feita com a separação das duas espécies em dois grupos, sendo possível visualizar que a maior variação ocorre dentro das populações (40%), mas a porcentagem de variação entre as espécies e entre os padrões foi semelhante (32% e 28% respectivamente). Na análise com quatro populações agrupadas por padrões de embrião a maior porcentagem da variação ocorreu entre as populações não conspecíficas dentro do mesmo padrão ($\Phi_{ST} = 0,60$; monoembriônicas $F_{st} = 0,62$ e poliembriônicas $F_{st} = 0,57$) (Tabela 4). A AMOVA realizada para as duas espécies mostrou que cerca da

metade da variação ocorre pela diferenciação entre as populações apomítica e sexuada (*E. gracilipes* = 53% e *E. pubescens* = 47%).

Na análise de coordenadas principais (PCO) (Figura 2), 64,36% da variação é explicada pelo primeiro eixo, mostrando uma separação entre as espécies, e as populações dentro de cada espécie formam um contínuo com praticamente nenhuma sobreposição. No segundo eixo, as populações de *E. pubescens* se separam, com sobreposição total das populações de *E. gracilipes* e o terceiro eixo separa as populações de *E. gracilipes*.

O dendograma Neighbor-joining separou as populações em dois grupos conspecíficos, mas apenas o formado pelas populações de *E. pubescens* recebeu elevado suporte de bootstrap (Figura 3). Os dendogramas Neighbor-joining feitos para os indivíduos, em ambas espécies houve a formação de dois grupos, correspondendo exatamente às duas populações, desta forma separando os indivíduos monoembriônicos dos poliembriônicos (Figura 4).

Na análise de genótipos multiloci realizada para verificar a presença de clones nas populações poliembriônicas, nenhum clone foi encontrado em *E. gracilipes*, mas para *E. pubescens* dois indivíduos foram identificados como clones. De acordo com a distribuição dos pares de indivíduos pelo número de loci em que esses se diferenciam (Figura 5), foi possível perceber que nas populações monoembriônicas das duas espécies os pares individuais são constantemente distribuídos dentre os números de loci que os diferenciam. Na população poliembriônica de *E. gracilipes* estes pares se concentram no intervalo entre 9 e 15 loci diferentes e na população poliembriônica de *E. pubescens* estão concentrados no intervalo de 15 a 21 loci diferentes.

Na análise Bayesiana o melhor valor de *K* foi 2, separando as duas espécies (Figura 6). Este resultado corrobora o PCO e os dendogramas de similaridade onde as populações de cada espécie foram agrupadas e separadas entre si.

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética: *P* = porcentagem de bandas polimórficas; *I* = Índice de Shannon; *H_e* = Heterozigosidade média esperada em quatro populações de *Eriotheca*.

Populações	N	<i>P</i> (%)	<i>I</i>	<i>H_e</i>
<i>E. gracilipes</i> / monoembriônica	17	50,51	0,294 ± 0,031	0,201 ± 0,021
<i>E. gracilipes</i> / poliembriônica	19	59,60	0,363 ± 0,031	0,251 ± 0,022
Média		55,05	0,328 ± 0,022	0,226 ± 0,015
<i>E. pubescens</i> / monoembriônica	19	66,25	0,396 ± 0,034	0,273 ± 0,024
<i>E. pubescens</i> / poliembriônica	19	68,75	0,396 ± 0,033	0,271 ± 0,023
Média		67,50	0,396 ± 0,023	0,272 ± 0,017

Tabela 4. Análise da variância molecular (AMOVA) das populações de *Eriothea*.

Origem da Variação	G.L	Soma dos quadrados	Componentes da variância	%Total da variância	P- valor
<u>Grupos entre as espécies</u>					
Entre grupos	1	510,388	9,386	32%	0,001
Entre as populações	2	326,005	8,187	28%	0,001
Dentro das populações	70	823,458	11,764	40%	0,001
Total	73	1659,851	29,337	100%	0,001
<u>Grupos entre padrões de embrionia</u>					
Entre grupos	1	177,199	0,000	0%	0,001
Entre as populações	2	681,333	17,991	60%	0,001
Dentro das populações	70	583,690	8,338	40%	0,001
Total	73	1442,222	26,329	100%	0,001
<u>E. gracilipes</u>					
Entre as populações	1	172,676	9,232	53%	0,001
Dentro das populações	34	238,445	7,013	47%	0,001
Total	35	411,121	16,245	100%	0,001
<u>E. pubescens</u>					
Entre as populações	1	169,479	8,418	47%	0,001
Dentro das populações	36	343,127	9,531	53%	0,001
Total	37	512,605	17,950	100%	0,001

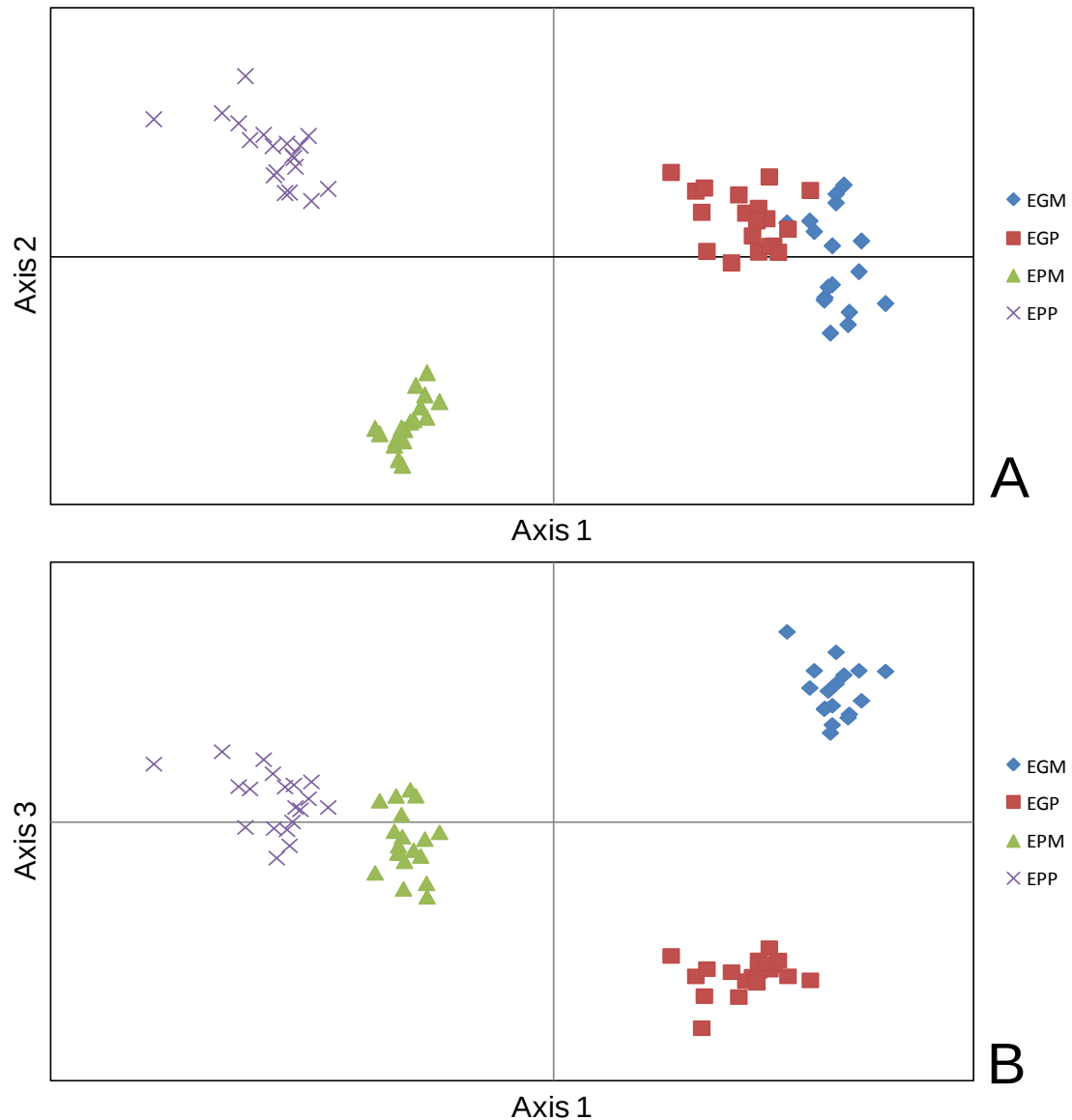


Figura 2. Representação dos escores da análise de coordenadas principais (PCO) da matrix de distância genética de 74 indivíduos de quatro populações de *Eriotheca*, baseado em 111 loci ISSR. Porcentagem da variância acumulada na Axis 1 = 64,36%, Axis 2 = 14,09% e Axis 3 = 12,13%. Legenda *E. gracilipes* monoembrionica (EGM), poliembriônica (EGP); *E. pubescens* monoembriônica (EPM) e poliembriônica (EPP).

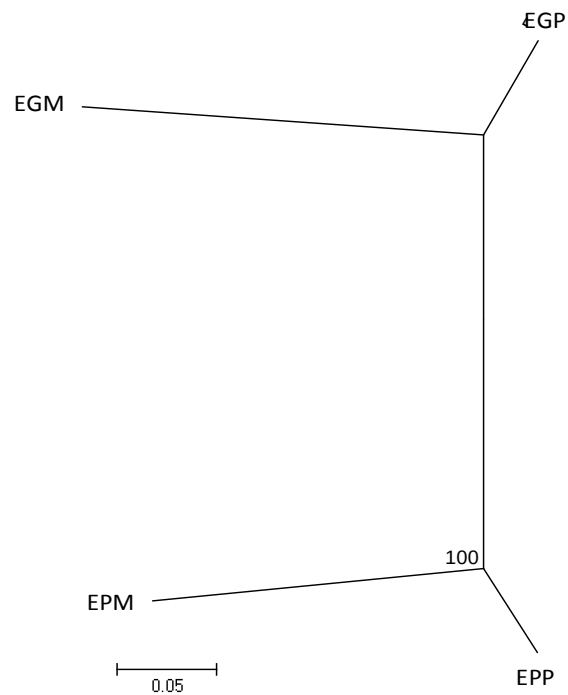


Figura 3. Dendrograma Neighbor-joining com base na distância genética não tendenciosa de Nei entre as populações de *Eriotheca*. Número sobre o ramo refere-se ao valor de *bootstrap*. Legenda *E. gracilipes* monoembriônica (EGM), poliembriônica (EGP); *E. pubescens* monoembriônica (EPM) e poliembriônica (EPP).

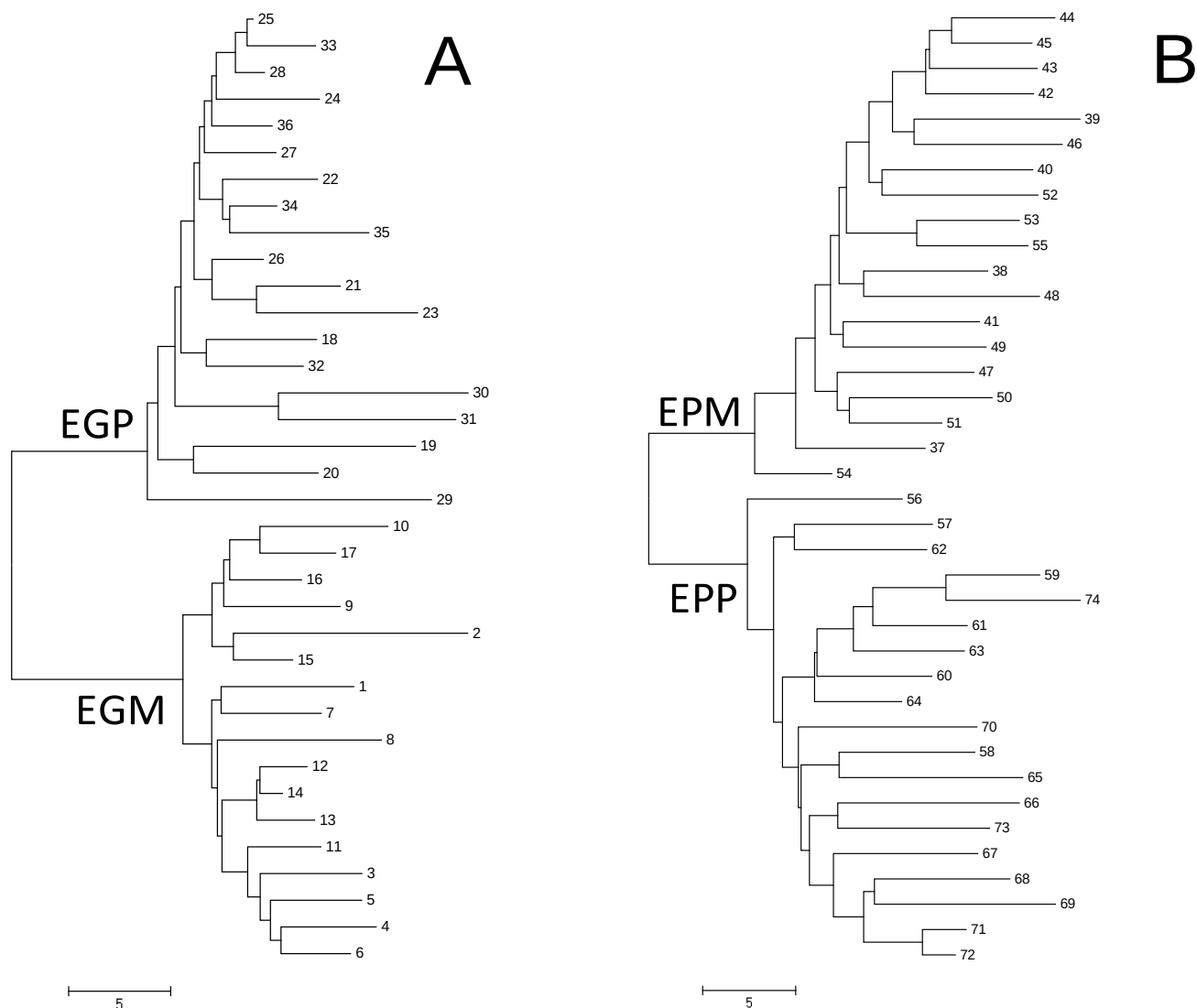


Figura 4. Dendrograma Neighbor-joining baseado na distância genética não enviesada de Nei a partir de 111 loci ISSR de 74 indivíduos de *Eriotheca*. A. Indivíduos das duas populações de *E. gracilipes* (1-17 população monoembriônica; 18-36 população poliembriônica). B. Indivíduos das duas populações de *E. pubescens* (37-55 população monoembriônica e 56-74 população poliembriônica).

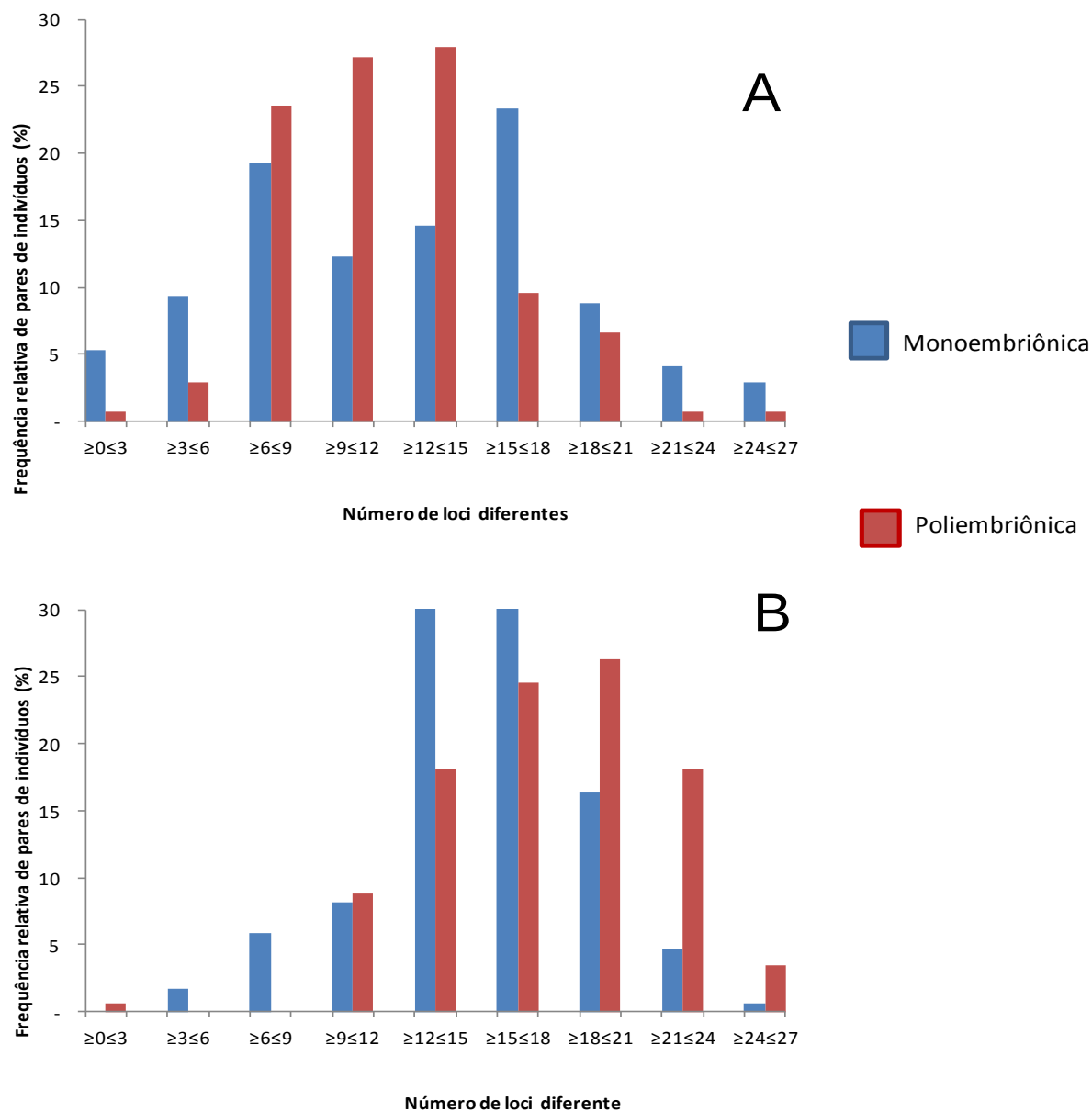


Figura 5. Quantidade de loci que diferencia indivíduos comparados par a par, obtidos com análise de genótipos multiloci, as barras em azul correspondem às populações monoembriônicas e as barras em vermelho correspondem às populações poliembriônicas. A. *E. gracilipes*. B. *E. pubescens*.

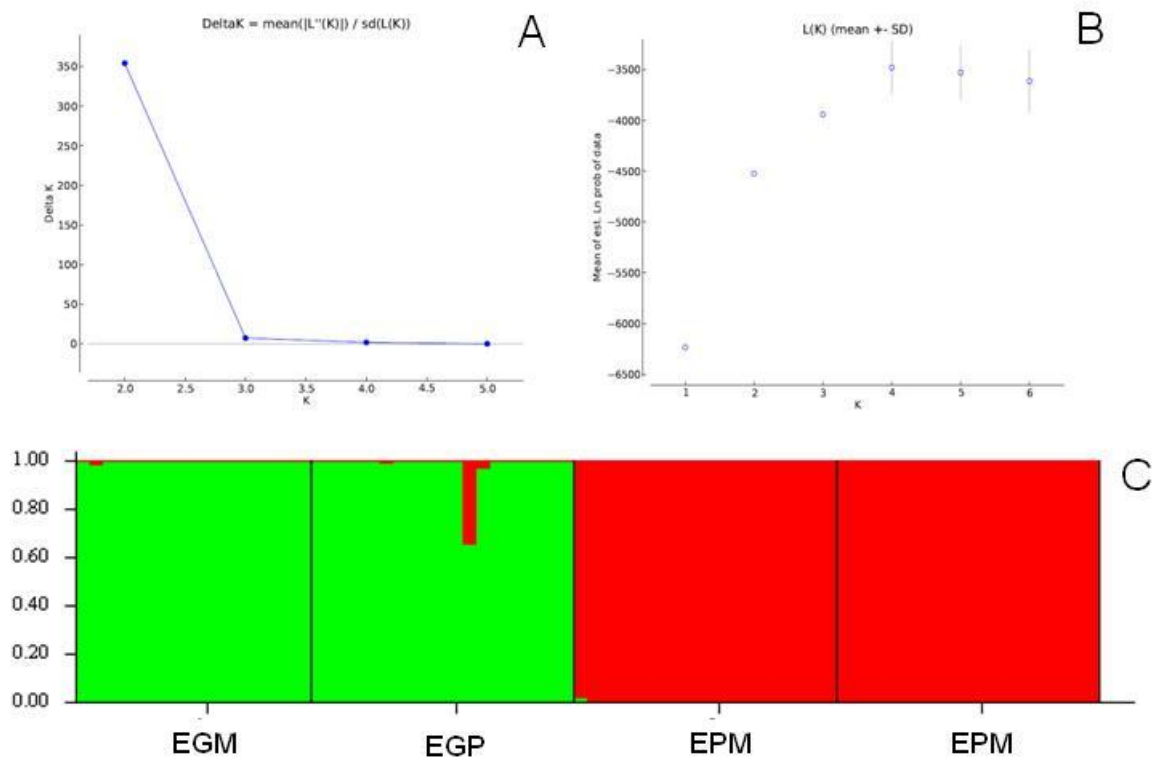


Figura 6. Análise Bayesiana de 74 indivíduos de *Eriotheca*. A. Gráfico ΔK . B. Gráfico LnP (D) resultante de 15 corridas independentes. C. Representação gráfica de dois grupos genéticos ($K=2$) em EGM, EGP, EPM, EPP. O real número de grupos genéticos correspondem ao maior valor de ΔK e estabilização de LnP (D).

Discussão

As populações apomíticas de *Eriotheca* apresentaram valores de diversidade genética próximos (*E. pubescens* $H_e = 0,271$) ou superiores (*E. gracilipes* $H_e = 0,251$) aos das populações sexuais conspecíficas (*E. pubescens* $H_e = 0,273$ e *E. gracilipes* $H_e = 0,201$). Teoricamente, em populações apomíticas, os indivíduos podem ter indivíduos geneticamente idênticos (clones) com elevada heterozigosidade (RICHARDS, 1996, 2003; HÖRANDL, 2006), como encontrado nessas populações de *Eriotheca*.

Porém, a formação de clones foi muito baixa nas populações apomíticas, provavelmente, devido à prevalência de eventos sexuais. Diferente do que foi indicado por análises com marcadores RAPD (MARTINS; OLIVEIRA, 2003), a população poliembriônica de *E. pubescens* aqui estudada mostrou apenas dois clones. Na população de *E. gracilipes* nenhum clone foi detectado, apesar de haver indivíduos muito próximos. No dendograma da distância genética entre os indivíduos, foi possível observar que nas populações apomíticas, os indivíduos são mais próximos, diferente do que se pode observar nas populações monoembriônicas. Em *Jatropha curcas*, que apresenta sistema reprodutivo misto assim como em *E. pubescens*, loci microssatélites mostraram poucos clones, cerca de 13% das plântulas analisadas (MAJESKY et al., 2012).

A diversidade genética presente em apomíticos pode ser devido à presença de mutações ou eventos facultativos de sexualidade (PAUN et al., 2006), que pode ser diretamente relacionada com a proporção de plantas que possuem origem sexual na população (RICHARDS, 2003). Situação semelhante foi descrita para *Syzygium paniculatum*, onde a embrionia adventícia e a poliploidia estão presentes, sendo observadas plântulas de origem sexuada em sementes poliembriônicas (THURLBY et al., 2012).

Não há outros estudos de diversidade genética em espécies do gênero *Eriotheca*, só foram encontrados estudos para gêneros próximos, com espécies tropicais, como *Adansonia* e *Ceiba*. Níveis menores de diversidade genética foram encontrados em *A. digitata* ($H_e = 0.18$ e $I = 0.21$) (MUNTHALI et al., 2013) e em *C. pentandra* níveis superiores ($H_e = 0.814$ a 0.895) (BRONDANI et

al.,2003), quando comparados com os encontrados para *Eriotheca*, ambos utilizando marcadores microsatélites.

Níveis de diversidade genética para espécies arbóreas do Cerrado, obtidos com marcadores dominantes e codominantes como Alloenzimas para *Annona crassiflora* o “araticunzeiro”, RAPD para *Plathymenia reticulata* e microsatélites para *Caryocar brasiliense*, *Dipteryx alata* e *Tibouchina papyrus*, foram altos ($H_e = 0,357$; $H_e = 0,332$; $H_e = 0,874$; $H_e = 0,451$; $H_e = 0,295$, respectivamente) (LACERDA, 2001; TELLES et al., 2003; COLEVATTI et al., 2010), superiores aos encontrados, mesmo para as populações monoembriônicas e sexuais de *Eriotheca* (*E. pubescens* $H_e = 0,273$ e *E. gracilipes* $H_e = 0,201$).

Uma compilação de dados, utilizando marcadores dominantes foi feita por Nybom (2004), sendo possível estabelecer uma comparação cautelosa, devido o baixo número de trabalhos analisados, entre os resultados obtidos nesse trabalho e a média da heterozigosidade esperada obtida em trabalhos que também utilizaram ISSR. Os resultados obtidos para *E. gracilipes* foram mais similares do que os de *E. pubescens* ($H_e = 0,226$ e $0,272$ respectivamente) quando comparados a média estabelecida na compilação ($H_e = 0,22$).

A forma de vida, o sistema reprodutivo, o modo de dispersão das sementes e a distribuição geográfica são fatores que influenciam a diversidade genética (HAMRICK; GODT 1996; NYBOM; BARTISH, 2000). A comparação entre estes fatores mostrou que o sistema reprodutivo tem forte influência na variação da diversidade genética intrapopulacional (HAMRICK; GODT, 1989; NYBOM; BARTISH, 2000). A diferenciação entre as populações apomíticas e sexuais de *E. gracilipes* ($\phi_{st}=0,53$) é intermediária a outras plantas que apresentam sistema de reprodução misto ($\phi_{st}=0,40$) e autofecundação ($\phi_{st}=0,65$). Quando a comparação é feita para as populações apomíticas e sexuais de *E. pubescens*, a diferenciação interpopulacional ($\phi_{st}=0,47$) é similar a valores encontrados para plantas com reprodução mista ($\phi_{st}=0,40$) (NYBOM, 2004).

A dispersão de sementes pelo vento (anemocoria) das espécies de *Eriotheca* pode propiciar aumento da diversidade intrapopulacional, sendo

também responsável pela redução da diferenciação interpopulacional, em ambos os casos, pela maior eficiência de fluxo gênico. É possível que propágulos com diferentes citótipos, dispersos pelo vento a distâncias relativamente grandes, aumentem a heterozigosidade (HAMRICK; GODT, 1989; NYBOM; BARTISH, 2000).

Os resultados obtidos corroboram com a separação entre as espécies *E. gracilipes* e *E. pubescens* já demonstrada no estudo por marcadores RAPD (MARTINS; OLIVEIRA 2003). Isto pode ser visualizado nas análises de PCO, no dendograma e na análise bayesiana, apesar dessas espécies serem morfologicamente semelhantes e filogeneticamente próximas (OLIVEIRA et al., 1992; DUARTE et al., 2011).

A ausência de mutação em linhagens únicas de clones, provavelmente está relacionada com uma origem recente da população (ARAKAKI et al. 2013). O contrário é visto para as espécies de *Eriotheca*, sugerindo que as populações apomíticas se originaram a tempo suficiente para que houvesse um acúmulo de mutações nas populações.

Geralmente, os apomíticos possuem parentes sexuais podendo ocorrer cruzamentos entre indivíduos apomíticos e indivíduos sexuais propiciando que a heterozigosidade fixada nestes apomíticos possa ser herdada (ALEM, 2003). Pouco se sabe sobre a distribuição dos padrões reprodutivos destas duas espécies, mas em *E. pubescens* há sobreposição dos padrões de embrionia em alguns locais (MENDES-RODRIGUES, 2010), possibilitando estes cruzamentos e a geração de clones com novos citótipos (van DIJK, 2003).

A variação genética entre populações analisadas é elevada (*E. gracilipes* $\phi_{st}=0,53$ e *E. pubescens* $\phi_{st}=0,47$), sendo que a variação genética encontrada entre os padrões de embrionia de cada espécie é semelhante à variação genética entre as duas espécies (28% e 32% respectivamente). Esta variação, juntamente, com a presença dos citótipos e a diferenciação do sistema reprodutivo indicam que, possivelmente, possa ocorrer especiação nestas duas espécies. Cruzamentos manuais entre ploidias distintas e o mapeamento destes padrões na área de distribuição dessas espécies são necessários para compreender melhor os processos evolutivos destas espécies.

Referências Bibliográficas

ARAKAKI, M.; SPERANZA, P.; SOLTIS, P.; SOLTIS, D.E. Genetic variability of an unusual apomictic triploid cactus, *Haageocereus tenuis* Ritter, from the coast of Central Peru. **Journal of Heredity**, v. 104, p. 127-133, 2013.

BAUM, D. A. e OGINUMA, K. A Review of chromosome numbers in bombacaceae with new counts for *Adansonia*. **Taxon**, v. 43, p. 11-20, 1994.

BICKNELL, R.A.; KOLTUNOW, A.M. Understanding Apomixis: Recent advances and remaining conundrum. **The Plant Cell**, v.16, p.228–245, 2004.

BIERZHCHUDEK, P. Patterns in plant pathogenesis. **Experientia**, v. 41, p. 1255-1264, 1985.

BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 2, p. 177–179, 2003.

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

CARMAN, J.G. Do duplicate genes cause apomixis? In: HÖRANDL E, Grossniklaus U, van Dijk P, Sharbel T (eds) Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives. Gantner, Ruggell, p.169–194, 2007.

COLLEVATTI, R.C.; LIMA, J.S.; SOARES, T.N.; TELLES, M.P.C. Spatial Genetic Structure and Life History Traits in Cerrado Tree Species: Inferences for Conservation. **Natureza & Conservação**, v.8, n.1, p.54-59, 2010.

Dijk, P. J. Van. Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 358, n. 1434, p. 1113-21, 2003.

DUARTE, M. C. **Análise filogenética de *Eriotheca* Schott & Endl . e gêneros afins (Bombacoideae , Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil São Paulo**, Tese (Doutorado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2010.

DUARTE, M. C.; ESTEVES, G. L.; SALATINO, M. L. F.; WALSH, K. C.; BAUM, D. A. Phylogenetic Analyses of *Eriotheca* and Related Genera (Bombacoideae, Malvaceae). **Systematic Botany**, v. 36, n. 3, p. 690–701, 2011.

DOYLE J. J., DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p.13–15, 1987.

ESSELMAN, E.J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D.J.; WINDUSS, J.L.; WOLFE, A.D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology** v,8, p. 443-451, 1999.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p. 574–578, 2007.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP: phylogeny inference package**, version 3.66. University of Washington, Seattle, 2006.

FIRETTI-LEGGIERI, F.; LOHMANN, L.G.; ALCANTRA, S.; COSTA, I.R.; SEMIR, J. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae , Bignoniaceae). **Plant Reproduction**, v. 35, p. 43-53, 2013.

FORNI-MARTINS, E. R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F. e CRUZ, N. D. Chromosome numbers in Brazilian Cerrado plants. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 281-288, 1995.

FORNI-MARTINS, E. R.; MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 947–955, 2000.

GUPTA, M.; CHYI, Y.S.; ROMERO-seVERSON, J.; OWEN, J.L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.998-1006, 1994.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A. H. D.; Clegg, M.; Kahler, T. A. L.; Weir, B. S. (eds.), p. 43-63. **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**, 1989.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant. **The Royal Society of London**, v. 351, p.1291–1298, 1996.

HÖRANDL, E. The complex causality of geographical parthenogenesis. **The New phytologist**, v. 171, p. 525-38, 2006.

HÖRANDL, E. The evolution of self-fertility in apomictic plants. **Sexual Plant Reproduction**, v. 23, p. 73-86, 2010.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, v. 5, p. 1425-1437, 1993.

KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 547-74, 2003.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M.D.P.; FILHO, J.P.L.; LOVATO, B.L. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 1143-52, 2001.

MAGLIO, C. A. F., FORNI-MARTINS, E. R., CRUZ, N. D. DA, I.O.P.B. Chromosome number reports LXXXIV. **Taxon**, v.33, p. 536-539, 1984.

MAJESKY, L.; VASUT, R.J.; KITNER, M.; TRÁVNÍČEK, B. The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. **Plos One**, v. 7, p.1-14, 2012.

MARTINS, R. L.; OLIVEIRA, P. E. RAPD Evidence for apomixis and clonal populations in *Eriotheca* (Bombacaceae). **Plant Biology**, v. 5, p. 338-340, 2003.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v. 264, p. 421-423, 1994.

MENDES-RODRIGUES, C.; CARMO-OLIVEIRA, R.; TALAVERA, S.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L.; OLIVEIRA, P.E. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). **Plant Biology**, v. 7, n. 5, p. 533–40, 2005.

MENDES-RODRIGUES, C. **Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010

MENDES-RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, P. E. Polyembryony in Melastomataceae from Brazilian Cerrado : multiple embryos in a small world. v. 14, p. 845-853, 2012.

MORAWETZ, W. Remarks on kariological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematics and Evolution**. v. 152, p. 49-100, 1986.

MUNTHALI, C. R. Y.; CHIRWA, P. W.; CHANGADEYA, W. J.; AKINNIFESI, F. K. Genetic differentiation and diversity of *Adansonia digitata* L.(baobab) in Malawi using microsatellite markers. **Agroforestry Systems**, v. 87, p.117–130, 2013.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000.

NYBOM, H.; BARTISH, I. V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3, n. 2, p. 93-114, 2000.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-55, 2004.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BARBOSA, A.A.; TALAVERA, S. Contrasting breeding system in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution**, v.179, p.207-219, 1992.

PAUN, O.; GREILHUBER, J.; TEMSCH, E. M.; HÖRANDL, E. Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). **Molecular Ecology**, v. 15, n. 4, p. 897–910, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p.288-295, 2006.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica** v.120, p.9–16, 2002.

RICHARDS, A.J. Genetic variability in obligate apomicts of the genus *Taraxacum*. **Folia Geobotanica et Phytotaxonomica**, v.31, p. 405-414, 1996.

RICHARDS, A. J. Apomixis in flowering plants: an overview. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Biological sciences**, v. 358, p. 1085-93, 2003.

SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Polyembryony in Angiospermous trees of the Brazilian Cerrado and Caatinga vegetation. **Acta Botanica Brasilica**, v.3, p. 369-378, 2001.

SAMPAIO, D.S. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2010.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; DePAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and Angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 336-348, 2009.

SOUZA, G. A.; RODRIGUES, M.C. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N.C.; OLIVEIRA, L.O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-849, 2008.

TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, L.F.B.; COELHO, A.S.G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, n.1, p.123-129, 2003.

THURLBY, K.A.G.; WILSON, P.G.; SHERWIN, W.B.; CONNELLY, C.; ROSSETTO, M. Reproductive bet-hedging in a rare yet widespread rainforest tree, *Syzygium paniculatum* (Myrtaceae). **Austral Ecology**, v.37, p.936-944, 2012.

VEKEMANS, X.; BEAUWENS, T.; LEMAIRE, M.; ROLDAN-RUIZ, I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular Ecology**, v.11, p.139–151, 2002.

CAPÍTULO 3

**RELAÇÃO ENTRE PLOIDIA E TAMANHO DO PÓLEN E DO ESTÔMATO DE
CITÓTIPOS DE *Eriotheca gracilipes* E *Eriotheca pubescens*.**

**RELAÇÃO ENTRE PLOIDIA E TAMANHO DO PÓLEN E DO ESTÔMATO DE
CITÓTIPOS DE *Eriotheca gracilipes* E *Eriotheca pubescens*.**

MARINHO, R.C.^{1*}; MENDES-RODRIGUES, C.²; BONETTI, A.M¹;
OLIVEIRA, P.E.²

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia-MG, Brasil.

²Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG,
Brasil.

Short communication em preparação.

*Corresponding author: Rafaela Cabral Marinho
e-mail:rafaelacabralmarinho@hotmail.com

RESUMO

A poliploidia é um fenômeno importante para a evolução vegetal e está sendo cada vez mais encontrada nas Angiospermas. Para estimativas de níveis de plodias em plantas, podem ser usadas análises morfométricas do grão de pólen e do estômato, que são diretamente influenciadas por esse fenômeno. *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns e *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl são espécies que ocorrem no bioma Cerrado e ao contrário da maioria das espécies deste bioma apresentam alto número de cromossomos. Estudos anteriores encontraram citótipos ressaltando a importância de mais estudos de ploidia nestas espécies. O objetivo do presente trabalho foi testar o método de morfometria para estimar a ploidia em *E. gracilipes* e *E. pubescens*. Botões florais e folhas de *E. gracilipes* foram coletados em Uberlândia - MG e Caldas-Novas - GO e de *E. pubescens* foram coletados na cidade de Cristalina - GO e em Uberlândia - MG. Foram utilizados botões florais pré-fixados em FAA 50% e folhas expandidas de indivíduos adultos. Fotos de grãos de pólen e estômatos de cinco indivíduos de cada população foram utilizadas para realizar medidas morfométricas de 50 estômatos e 50 grãos de pólen para cada indivíduo, com auxílio do programa Image J. Os resultados demonstram que nessas duas espécies todas as medidas foram diferentes nos citótipos. Os indivíduos hexaplóides apresentaram medidas maiores do que os indivíduos tetraplóides e diplóides, mostrando que estas ferramentas são eficientes para análise de ploidia em *E. gracilipes* e em *E. pubescens*.

Palavras-chave: Poliploidia, citótipos, grão de pólen, estômato, *Eriotheca*.

ABSTRACT

Polyploidy is an important phenomenon for the evolution of plant and is being increasingly found in Angiosperms. To estimate ploidy levels in plants can be used morphometric analyzes of the pollen grain and the stomata, which are directly influenced by this phenomenon. *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns and *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl are species that occur in the Cerrado and unlike most species of this biome have a high number of chromosomes. Previous studies found cytotypes emphasizing the importance of further studies of ploidy in these species. The objective of this study was to test the method of morphometry to estimate ploidy in *E. gracilipes* and *E. pubescens*. Flowers buds and leaves of *E. gracilipes* were collected in Uberlândia - MG and Caldas Novas - GO and *E. pubescens* were collected in the city of Crystalline - GO and Uberlândia - MG. Flower buds pre-fixed in FAA 50% and expanded leaves of adult individuals were used. Photos of pollen grains and stomata of five individuals from each population were used to perform morphometric measurements of 50 stomata and 50 pollen grains for each individual using the program Image J. The results demonstrate that in these species all measures were different in cytotypes. Hexaploid individuals showed higher values than the individuals diploid and tetraploid, showing that these are efficient tools for analysis of ploidy *E. gracilipes* and *E. pubescens*.

Keywords: Polyploidy, cytotypes, grain pollen, stomata, *Eriotheca*.

Nas Angiospermas, cerca de 70% das espécies são poliplóides ou se originaram de eventos de poliploidia (MASTERSON, 1994). A poliploidia é a presença de mais de dois conjuntos cromossômicos em uma célula, fenômeno frequente e importante na evolução dos vegetais (SOLTIS et al., 2009). Esta pode ser uma forma rápida de adaptação e especiação (RAMSEY; SCHEMSKE, 1998), pois estima-se que cerca de 2-4 % dos eventos de especiação em angiospermas estão associados com a poliploidia (OTTO; WHITTON, 2000). Organismos poliplóides podem ter o tamanho celular proporcionalmente aumentado de acordo com a ploidia, quando estes são comparados com organismos diplóides (STEBBINS, 1950; SUGIMOTO-SHIRASU; ROBERTS, 2003; MURTI et al., 2012), indicando que o aumento no tamanho do genoma causado pela poliploidização influencia diretamente no tamanho de órgãos e a estatura dos indivíduos nas Angiospermas (MIZUKAMI, 2001).

Devido à alta prevalência de poliploidia nas Angiospermas, foi necessário o desenvolvimento de técnicas simples e reprodutíveis para rápida determinação do nível de ploidia (STORME; ZAMARIOLA, 2013). Medidas do tamanho do grão de pólen e do estômato foram utilizadas como estimadores de ploidia, comparando indivíduos diplóides e poliplóides principalmente em espécies cultivadas (PRZYWARA et al., 1988, MASTERSON, 1994). Porém, Tate e Simpson (2004) demonstram que em algumas espécies do gênero *Tarasa* (Malvaceae) essa relação não está presente.

A poliploidia é presente em diversas espécies do Cerrado (MORAWETZ, 1986). Número de cromossomos relativamente baixo é predominante nesse bioma, com algumas exceções, especialmente em espécies de Bombacoideae (Malvaceae) (FORNI-MARTINS; MARTINS, 2000). Esta subfamília é representada, principalmente, por espécies arbóreas neotropicais, exclusivamente paleopoliplóides, com cromossomos pequenos e numerosos (MORAWETZ, 1986; GIBBS et al., 1988; BAUM; OGINUMA, 1994). O gênero *Eriotheca* possui espécies frequentemente encontradas no Cerrado, como *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns encontrada em florestas semi-decíduais ou restritas a este bioma e *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.)

Schott & Endl encontrada exclusivamente em áreas de Cerrado (DUARTE, 2010).

Foram encontrados citótipos nestas espécies que parecem estar relacionados com um mosaico reprodutivo, onde citótipos hexaplóides ($2n=6x=276$) são poliembriônicos e apomíticos e citótipos tetraplóides e diplóides ($2n=2x=92$; $2n=4x=184$) são sexuais e monoembriônicos (OLIVEIRA et al., 1992; MENDES-RODRIGUES et al., 2005; MENDES-RODRIGUES, 2010). O citótipo diplóide de *E. gracilipes* e hexaplóide de *E. pubescens* são mais distribuídos que os demais (MENDES-RODRIGUES, 2010). O conhecimento desses citótipos e sua distribuição são importantes para deduções a respeito do processo evolutivo das espécies (FORNI-MARTINS et al., 1995; BALAO et al., 2009).

O objetivo desse estudo foi verificar se análises morfométricas do grão de pólen e do estômato podem ser empregadas como estimadores da ploidia em citótipos *E. gracilipes* e *E. pubescens*.

As populações utilizadas nesse estudo já haviam sido caracterizadas, quanto ao número cromossômico e sistema reprodutivo por Oliveira et al. (1992) e Mendes-Rodrigues (2010). Flores e folhas de indivíduos diplóides de *E. gracilipes* foram coletadas em Uberlândia-MG e de indivíduos poliplóides foram coletadas em Caldas-Novas-GO. O material biológico de indivíduos tetraplóides de *E. pubescens* foram coletados próximo à cidade de Cristalina-GO, e o de indivíduos hexaplóides em Uberlândia-MG. Foram utilizados botões florais pré-fixados em FAA 50% e folhas expandidas de indivíduos adultos que foram mantidas secas em sílica gel. Em média, cinco indivíduos de cada população foram analisados separadamente para as medidas do tamanho do grão de pólen e do estômato.

Para confecção de lâminas de grão de pólen anteras de três botões florais de cada indivíduo foram selecionadas ao acaso e colocadas em solução de Carmin Acético (2%) sobre lâmina, posteriormente, cobertas com lamínula (MURTI et al., 2012), que foram analisadas e fotografadas imediatamente após a confecção.

Para confecção de lâminas de estômatos, foi utilizada a técnica de decalque, que consiste na retirada da impressão foliar, utilizando cola

instantânea de cianoacrilato (Loctite Super Bonder) sobre uma lâmina (CHIN et al., 1995). Três lâminas, de cada indivíduo, foram feitas utilizando a região central e as regiões de extremidade dos folíolos. A presença de tricomas nos folíolos de *E. pubescens* dificultou a montagem das lâminas, sendo necessária a retirada manual da maior quantidade possível dos tricomas.

As lâminas de grão de pólen e estômato foram fotografadas em microscópio óptico BX 51(Olympus), acoplado com câmera digital DP70 (Olympus) e capturadas pelo programa DP manager. A partir das fotos foram realizadas as medidas de comprimento e largura dos estômatos, diâmetro máximo, mínimo e área do grão de pólen, com auxílio do programa Image J (ABRAMOFF et al., 2004). Cinquenta estômatos e cinquenta grãos de pólen foram medidos em cada indivíduo. O programa Sisvar (FERREIRA, 2008) foi utilizado para realizar Nested ANOVA das medidas, utilizando como parâmetro os padrões de ploidia e indivíduos aninhados dentro dos padrões de ploidia. O teste de Tukey foi utilizado para avaliar as diferenças entre os indivíduos dentro de cada padrão.

Os resultados obtidos demonstraram que nas duas espécies todas as medidas realizadas foram diferentes entre os citótipos. Os citótipos hexaplóides apresentaram medidas sempre maiores do que os indivíduos tetraplóides que foram maiores que os diplóides apenas nas análises de grão de pólen. As medidas dos padrões hexaplóides das duas espécies foram próximas em algumas medidas de diâmetro do grão de pólen, mesmo se tratando de espécies diferentes.

O tamanho do grão de pólen de *E. pubescens* foi maior do que o de *E. gracilipes*, sendo que o inverso acontece com as medidas dos estômatos, onde os de *E. gracilipes* foram sempre maiores do que os de *E. pubescens*. Há uma variação nas medidas de indivíduos dentro do mesmo padrão, mas para a maioria das medidas, não foi encontrada sobreposição entre indivíduos de padrões diferentes.

O citótipo hexaplóide de *E. gracilipes* apresentou a maior média da largura do estômato seguida da sua população diplóide (16,76 μm e 14,38 μm $F_{3,837} = 286,724$; $p < 0,001$) sendo, portanto, maior que a população hexaplóide e tetraplóide de *E. pubescens* (11,48 μm e 9,17 μm $F_{3,837} = 286,724$; $p < 0,001$).

Os estômatos da população hexaplóide de *E. gracilipes* apresentaram maior altura, seguido da sua população diplóide, da população hexaplóide e da tetraplóide de *E. pubescens* (32, 77 μm ; 26,42 μm ; 25,70 μm ; 20,97 μm $F_{3,837} = 423,869$ $p < 0,001$) (Figuras 1 e 2).

Em contraste com os dados de estômato, o tamanho do grão de pólen em *E. pubescens* foi maior (Figuras 3, 4 e 5). O diâmetro máximo entre os padrões hexaplóides de *E. gracilipes* e *E. pubescens* se sobrepuseram (37,21 μm e 37, 86 μm , $F_{3,1080} = 152,875$ $p < 0,001$) (Figura 3), seguidas do diâmetro máximo dos tetraplóide de *E. pubescens* e diplóides de *E. gracilipes* (34,58 μm ; 32,77 μm $F_{3,1080} = 152,875$ $p < 0,001$). A relação do diâmetro mínimo e área do grão de pólen foi similar ao demonstrado para o diâmetro máximo do grão de pólen, mas os padrões hexaplóides não se sobrepuseram apesar de serem próximos (Figuras 4 e 5). É possível estabelecer uma escala entre a maior e menor média individual de cada citótipo, para cada medida realizada, mas as medidas devem ser avaliadas dentro de cada espécie, visto que em apenas uma das medidas os padrões hexaplóides das espécies apresentaram sobreposição.

Os resultados obtidos mostram diferenças morfométricas, tanto entre os estômatos, quanto entre os grãos de pólen, claramente associadas às diferenças de ploidia, que deve influenciar no tamanho celular. A estrutura floral de *E. gracilipes* e *E. pubescens* é muito similar, sendo que uma das diferenças está relacionada com o tamanho da flor, que em *E. pubescens* é maior (OLIVEIRA et al., 1992), podendo estar diretamente relacionada com a ploidia das populações analisadas.

Outros estudos confirmam a relação entre tamanho celular e ploidia. Em kiwi o comprimento do estômato foi um critério significativo de separação entre plantas haplóides e diplóides (PRZYWARA et al., 1988). Em *Coffea*, plantas tetraplóides possuem estômatos maiores e diminuição da frequência de estômatos na superfície foliar (MISHRA, 1997) assim como encontrado no morango (MURTI et al., 2012). Em trigo, a largura do estômato é maior nos poliplóides do que nos diplóides e a quantidade de estômatos nos poliplóides é menor do que no diplóide (KHAZAEI; MONNEVEUX, 2010). Em *Acacia mearnsii* essa relação foi, também, significativa e o uso desta ferramenta foi

indicado, visto o alto número de cromossomos da espécie (BECK et al., 2003). Em *Paspalum notatum* estômatos foram usados eficientemente como método de indentificação de ploidia (QUESENBERRY; DAMPIER, 2010). Em mutantes de *Arabidopsis thaliana*, o tamanho do pólen foi relacionado aos diferentes níveis de ploidia (ALTMANN et al., 1994).

Masterson (1994) utilizou a medida de estômatos, em fósseis de Angiospermas primitivas, para estimar a porcentagem de Angiospermas que são poliplóides, conseguindo fazer várias inferências a respeito da evolução da ploidia nas Angiospermas. A análise de pólen é uma ferramenta útil para distinguir a ploidia e, ainda, traz mais informações a respeito do sistema reprodutivo, pois avalia a estrutura reprodutiva masculina (STORME; ZAMARIOLA, 2013).

Os resultados aqui obtidos indicam que as análises morfométricas, tanto para os estômatos quanto para grãos de pólen, separam bem os padrões de ploidia e podem ser utilizados como indicadores para mapeamento desta característica numa escala regional.

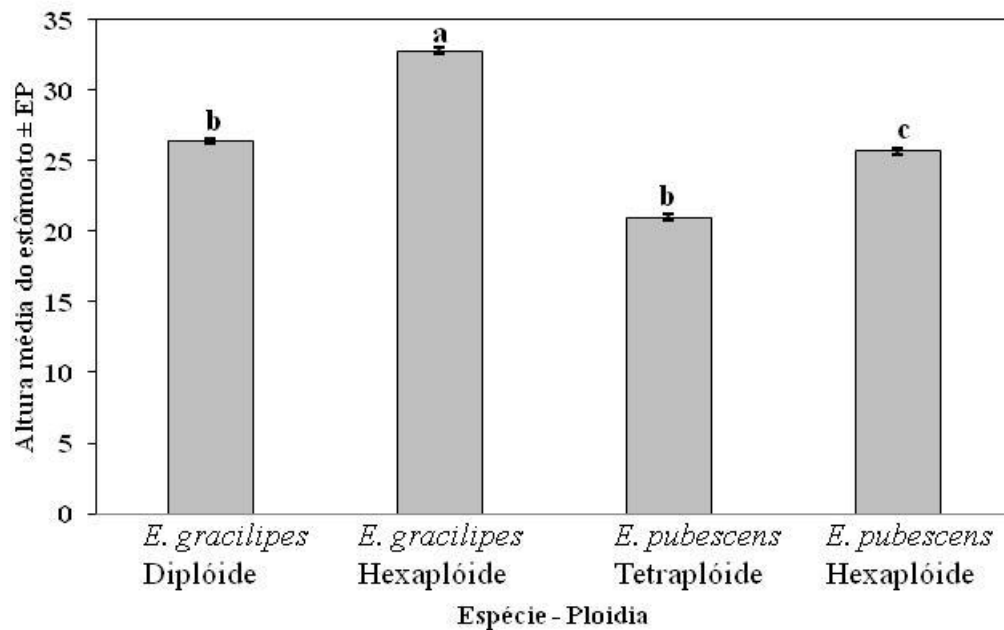


Figura 1 Altura média em μm (micrômetros) dos estômatos nos citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,837} = 286,724$; $p < 0,001$).

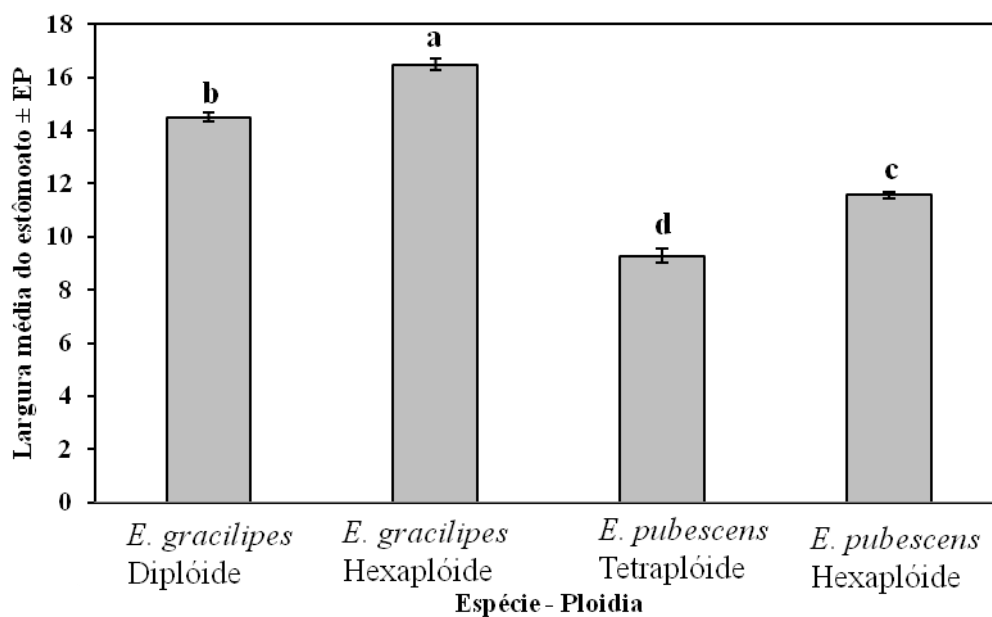


Figura 2 Largura média em μm (micrômetros) dos estômatos nos citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,837} = 423,869$; $p < 0,001$).

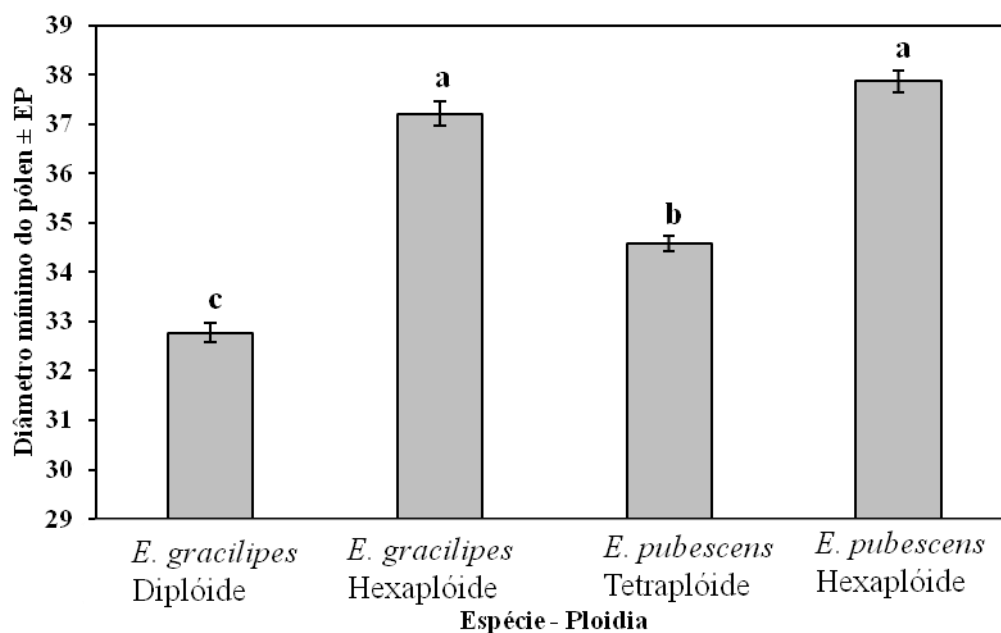


Figura 3 Diâmetro mínimo em μm (micrômetros) dos grãos de pólen de *Eriothea gracilipes* e *Eriothea pubescens*, Malvaceae ($F_{3, 1080} = 152,875$ $p < 0,001$).

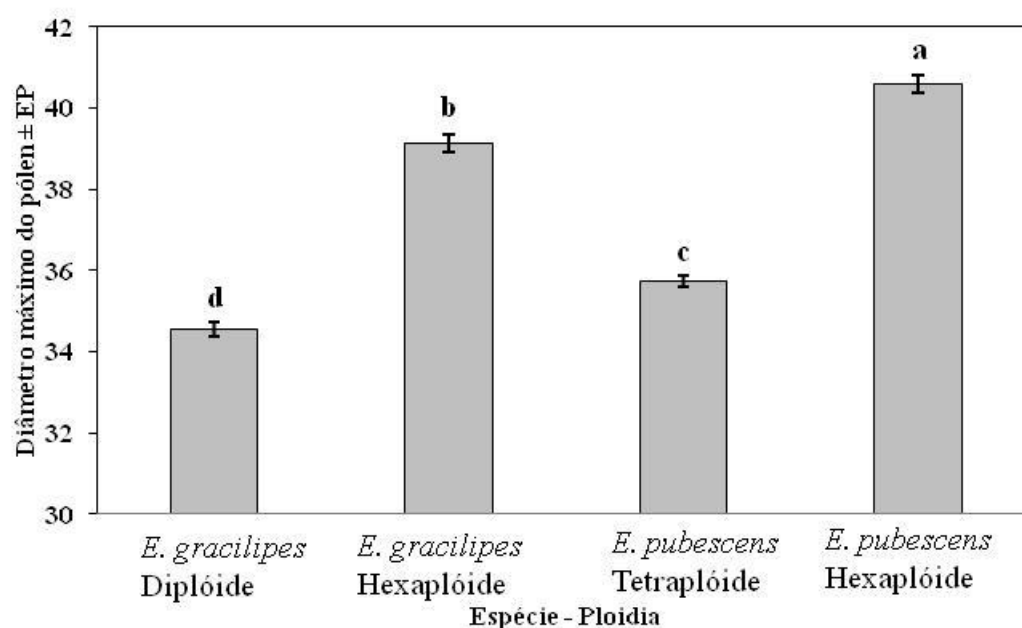


Figura 4 Diâmetro máximo em μm dos grãos de pólen de *Eriothea gracilipes* e *Eriothea pubescens*, Malvaceae ($F_{3, 1080} = 252,826$ $p < 0,001$).

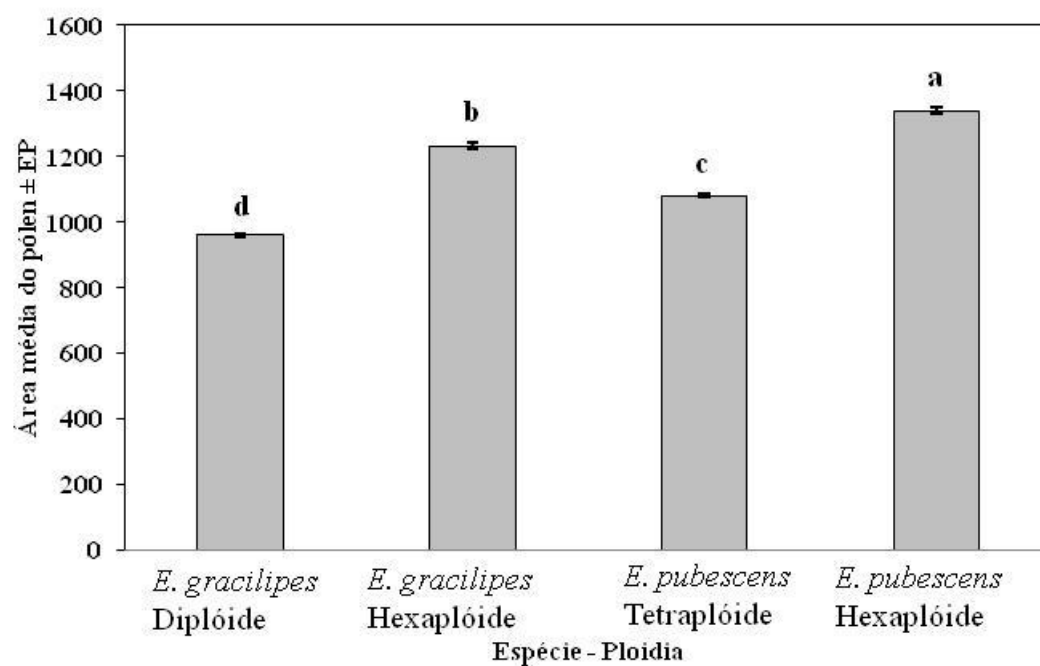


Figura 5 Área média em μm^2 (micrômetros) dos grãos de pólen de citótipos de *Eriotheca gracilipes* e *Eriotheca pubescens*, Malvaceae ($F_{3,1080} = 654,747$ $p < 0,001$).

Referências Bibliográficas

ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v.11, p.36-42, 2004.

ALTMANN, T.; DAMM, B.; FROMMER, W.B.; MARTIN, T.; MORRIS, P.C.; SCHWEIZER, D.; WILLMITZER, L.; SCHMIDT, R. Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. **Plant Cell Reports**, v.13, p.652-656, 1994.

BALAO, F.; CASIMIRO-SORIGUER, R.; TALAVERA, M.; HERRERA, J.; TALAVERA, S. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. **Annals of Botany**, v. 104, n. 5, p. 965-73, 2009.

BAUM, D. A.; OGINUMA, K. A Review of chromosome numbers in Bombacaceae with new counts for *Adansonia*. **Taxon**, v. 43, n. 1, p. 11-20, 1994.

BECK, S. L.; DUNLOP, R. W.; FOSSEY, A. Stomatal length and frequency as a measure of ploidy level in black wattle, *Acacia mearnsii* (de Wild). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 177-181, 2003.

CHIN, J.; WAN, J.; SMITH, J.; CROXDALE, J. Linear aggregations of stomata and epidermal cells in *Tradescantia* leaves: evidence for their group patterning as a function of the cell cycle. **Developmental Biology**, v.168, p. 39-46, 1995.

FERREIRA, D.F.. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium** v.6, p.36–41, 2008.

FORNI-MARTINS, E. R.; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Chromosome numbers in Brazilian Cerrado plants. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 281-288, 1995.

FORNI-MARTINS, E. R.; MARTINS, F. R. Chromosome studies on Brazilian Cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 947-955, 2000.

GIBBS, P.E.; SEMIR, J.; CRUZ, N.D. The proposal to unite the genera *Chorisia* Kunth and *Ceiba* Miller (Bombacaceae). **Notes from the Royal Botanical Garden**, v.45, p.125-136, 1988.

KHAZAEI, H.; MONNEVEUX, A. P. Variation for stomatal characteristics and water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 57, p. 307-314, 2010.

MASTERSON, J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. **Science**, v. 264, n. 22, p. 421-423, 1994.

MENDES-RODRIGUES. **Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

MENDES-RODRIGUES, C.; CARMO-OLIVEIRA, R.; TALAVERA, S.; ARISTA, M.; ORTIZ, P.L.; OLIVEIRA, P.E. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). **Plant Biology**, v. 7, n. 5, p. 533–40, 2005.

MISHRA, M. K. Stomatal characteristics at different ploidy levels in *Coffea* L. **Annals of Botany**, v. 80, p. 689-692, 1997.

MIZUKAMI, Y. A matter of size : developmental control of organ size in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 4, p. 533-539, 2001.

MORAWETZ, W. Remarks on kariological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematics and Evolution**, v. 152, p. 49-100, 1986.

MURTI, R. H.; KIM, H. Y.; YEOUNG, Y. R. Morphological and anatomical characters of ploidy mutants of strawberry. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.14, p. 204-210, 2012.

OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BARBOSA, A.A.; TALAVERA, S. Contrasting breeding systems in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution**, v. 179, p. 207-219, 1992.

OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review Genetic**, v. 34, p. 401-437, 2000.

PRZYWARA, L.; PANDEY, K. K.; SANDERS, P. M. Length of stomata as an indicator of ploidy level in *Actinidia deliciosa*. **New Zealand Journal of Botany**, v. 26, p. 179-182, 1988.

QUESENBERRY, K. H.; DAMPIER, J. M. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v. 175, p. 43-50, 2010.

RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 467-501, 1998.

SOLTIS, D. E.; ALBERT, V.A.; LEEBENS-MACK, J.; BELL, C.D.; PATERSON, A.H.; ZHENG, C.; SANKOFF, D.; DePAMPHILIS, C.W.; WALL, P.K.; SOLTIS, P.S. Polyploidy and Angiosperm diversification. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 336-348, 2009.

STEBBINS, G L. Variation and evolution in plants. **Columbia University Press**, New York, 1950.

STORME, N. De; ZAMARIOLA, L. Volume-based pollen size analysis: an advanced method to assess somatic and gametophytic ploidy in flowering plants. **Plant Reproduction**, v.2, p.65-81, 2013.

TATE, J. A.; SIMPSON, B. B. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploid species. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 207-213, 2004.

Material suplementar

Tabela S1: Valores médios da largura e altura dos estômatos de *E.gracilipes* e *E. pubescens*. As médias são seguidas pelo erro padrão e se seguidas de letras distintas dentro de cada citótipo apresentam diferenças significativas baseadas no teste de Tukey.

Espécie	2n	Indivíduo	Altura (µm)	Largura (µm)
<i>E.gracilipes</i>	2x=92	1	25,57 ± 0,45 b	14,38 ± 0,28 a
		2	25,44 ± 0,34 b	12,56 ± 0,29 b
		3	26,52 ± 0,35 ab	15,39 ± 0,36 a
		4	28,18 ± 0,34 a	14,89 ± 0,34 a
		5	26,38 ± 0,26 b	14,73 ± 0,26 a
<i>E.gracilipes</i>	6x=276	1	32,07 ± 0,41 b	17,36 ± 0,47 a
		2	34,65 ± 0,32 a	16,98 ± 0,35 ab
		3	32,76 ± 0,90 b	16,70 ± 0,68 ab
		4	32,77 ± 0,22 b	17,14 ± 0,33 a
		5	31,35 ± 0,44 b	15,62 ± 0,41 b
<i>E.pubescens</i>	4x=184	1	21,09 ± 0,46 a	9,28 ± 0,45 a
		2	20,84 ± 0,46 a	9,05 ± 0,51 a
		3	21,94 ± 0,58 a	9,91 ± 0,73 a
		4	20,10 ± 0,43 a	8,51 ± 0,46 a
<i>E.pubescens</i>	6x=276	1	25,08 ± 0,40 bc	10,21 ± 0,24 b
		2	27,32 ± 0,60 a	12,06 ± 0,35 ab
		3	26,43 ± 0,45 ab	12,31 ± 0,32 a
		4	25,62 ± 0,35 abc	11,73 ± 0,26 a
		5	24,26 ± 0,54 d	11,09 ± 0,26 a

Tabela S2: Valores médios da largura, altura e área dos grãos de pólen de *E. gracilipes* e *E. pubescens*. As médias são seguidas pelo erro padrão e se seguidas de letras distintas dentro de cada citótipo apresentam diferenças significativas baseadas no teste de Tukey.

Espécie	2n	Indivíduo	Diâmetro máximo (µm)	Diâmetro mínimo (µm)	Área (µm ²)
<i>E.gracilipes</i>	2x=92	1	32,15 ± 0,43 ab	34,08 ± 0,38 b	913,67 ± 12,59 c
		2	31,68 ± 0,37 b	33,70 ± 0,40 b	946,54 ± 14,82 bc
		3	33,08 ± 0,30 b	33,91 ± 0,30 ab	914,73 ± 11,94 c
		4	34,27 ± 0,47 a	35,51 ± 0,40 a	997,16 ± 11,43 ab
		5	32,81 ± 0,47 a	35,6 ± 0,34 ab	1030,47 ± 12,02 a
<i>E.gracilipes</i>	6x=276	1	38,93 ± 0,48 a	39,72 ± 0,52 a	1232,84 ± 13,35 b
		2	35,8 ± 0,46 ab	38,82 ± 0,40 c	1183,32 ± 14,80 bc
		3	38,23 ± 0,57 a	40,18 ± 0,54 ab	1399,53 ± 18,92 a
		4	35,83 ± 0,52 b	38,09 ± 0,47 c	1172,91 ± 11,69 c
		5	37,24 ± 0,57 ab	38,86 ± 0,48 bc	1174,70 ± 26,68 c
<i>E.pubescens</i>	4x=184	1	33,79 ± 0,36 ab	36,24 ± 0,43 bc	1066,39 ± 15,71 c
		2	35,18 ± 0,37 ab	35,11 ± 0,31 ab	1073,17 ± 11,52 bc
		3	35,80 ± 0,40 a	36,26 ± 0,35 a	1165,97 ± 10,98 a
		4	32,64 ± 0,30 b	34,55 ± 0,39 c	997,69 ± 11,10 d
		5	34,44 ± 0,39 ab	35,72 ± 0,31 abc	1044,78 ± 8,98 cd
		6	35,98 ± 0,32 a	36,32 ± 0,30 a	1130,29 ± 10,07 ab
		7	34,28 ± 0,44 ab	36,02 ± 0,32 abc	1080,03 ± 11,10 bc
<i>E.pubescens</i>	6x=276	1	35,59 ± 0,43 c	39,28 ± 0,47 d	1259,50 ± 15,70 c
		2	37,20 ± 0,37 c	38,92 ± 0,31 cd	1271,89 ± 15,62 c
		3	39,81 ± 0,40 ab	41,64 ± 0,54 a	1355,39 ± 18,21 b
		4	37,67 ± 0,46 bc	40,43 ± 0,41 bc	1358,54 ± 18,23 b
		5	39,27 ± 0,51 a	42,68 ± 0,44 ab	1451,60 ± 18,36 a

CAPÍTULO 4

Chromosome numbers reflect the phylogeny of Malvaceae? New counts for the Bombacoideae and a review of cytology in the Malvaceae l.s.

Chromosome numbers reflect the phylogeny of Malvaceae? New counts for the Bombacoideae and a review of cytology in the Malvaceae l.s.

Marinho, R.C., Mendes-Rodrigues, C., Yamagishi-Costa, J., Arista, M., Ortiz, P.L. Balao, F. & Oliveira, P.E.

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil.

²Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil.

Trabalho em preparação para submissão ao periódico Taxon

*Corresponding author: Rafaela Cabral Marinho

e-mail:rafaelacabralmarinho@hotmail.com

Abstract

Cytogenetic studies are important for the characterization of plant taxa since they can support taxonomic studies, allow evaluate cytological diversity and identify polyploidy events. Polyploidy may be associated with breakdown of self-incompatibility, apomixis and polyembryony, and is present in many species in the Cerrado biome, the Neotropical savanna region in Central Brazil. We aimed here to contribute with new chromosome counts for six Cerrado Bombacoideae species and revised all the chromosome numbers described for the family Malvaceae s.l. as a whole (568 species), focusing on a comparison between Bombacoideae and Malvoideae. For the Cerrado species, we collected and studied chromosome number from root meristems of *Eriotheca candolleana*, *E. gracilipes*, *Eriotheca pubescens*, *Pachira glabra*, *Pseudobombax longiflorum* and *Pseudobombax tomentosum*. For the general survey on the family Malvaceae s.l. we used data available in literature and already compiled in the Index to Plant Chromosome Numbers. We compiled chromosome numbers for 568 species in 103 genera for the Malvaceae s.l. (ca. 25% of the species in the family) and 37 species in 11 genera for the Bombacoideae (from a total of ca.18 genera and 187 species). There were clear differences in the mean chromosome numbers between the subfamilies, with the lowest numbers found in Helicterioideae and the highest in the Tilioideae. The Malvoideae and Bombacoideae presented clearly distinct chromosome number that allied to monophyly could provide some support the traditional families Bombacaceae and Malvaceae. The finds have implications for the understanding of evolution, phylogeny and ecology of Cerrado Bombacoideae species and for the taxonomy of the Malvaceae (s.l.).

Keywords: Polyploidy, chromosome number, Bombacoideae, Malvaceae, *Eriotheca*, Cerrado.

Introduction

Cytogenetic methods have been used for plant taxonomic studies since last mid-century, mostly for temperate species. These studies permitted to understand evolution, species segregation and population features. Chromosome counting and analysis are relatively quick, simple and unexpensive tools which allow to study the karyotypic diversity and identify polyploidy and aneuploidy events, which can explain species boundaries and contribute to taxonomic studies (Guerra 2008). Improved techniques and phylogenetic studies have somewhat revived the interest in cytological data (Soltis et al. 2009), which have helped to confirm taxa circumscription and allowed to understand the evolutionary process in many groups (Soltis & Soltis 2000).

Polyploidy is frequent and important phenomenon for plant evolution (Soltis & Soltis 2000, Soltis et al. 2009). Polyploidy may lead to rapid adaptive change and speciation (Ramsey & Schemske 1998), and diverse estimates indicate that ca. 2-4 % of speciation events in the angiosperms are associated with polyploidy (Otto & Whitton 2000). Moreover, ca. 70% of the angiosperms species are considered polyploid or originated from polyploidy events (Masterson 1994). Different cytotypes may coexist in a population, resulting in ecological and evolutionary variation, although the polyploids themselves may diversify at lower rates (Mayrose et al. 2011). Hence, understanding these cytotypes and their distribution is important in order to foresee the evolutionary process of different taxa (Balao et al. 2009, Forni-Martins et al. 1995).

Actually, since polyploidy is very common, some authors argue that most angiosperms are polyploid in origin, with chromosome numbers much higher than that of the basic number for the group, even for putatively diploid groups there is evidence of ancient whole genome duplication (Soltis et al. 2009). The basic number is usually estimated from a general profile of chromosome counts in a group. From this ancestral number, it is possible to analyze the variation and evolution of ploidy levels (Forni-Martins et al. 1995). Based on the distribution of chromosome counts and frequency of odd and even numbers, the

basic number for the angiosperms would be 7 or 9, but certainly smaller than $x=13$ (Grant 1963, Masterson 1994).

Apomixis, seed production by asexuality, is much more common in polyploids than in diploid angiosperms (Bicknell & Koltunow 2004). This relationship has been reported consistently for temperate plants that are commonly gametophytic apomicts (Hörandl, 2010). Recently, some studies have pointed out to a similar association between polyploidy and sporophytic apomixis, which is more common in tropical plants (e.g. Mendes-Rodrigues et al. 2005, Sampaio et al. 2013, Firetti-Leggieri et al., 2013). Polyploidy and apomixis are also associated with polyembryony, which has been used as an indicator of apomixis (Carman 1997, Mendes-Rodrigues 2010, Sampaio 2010, Mendes-Rodrigues & Oliveira 2012). Polyploidy events may also lead to the breakdown of self-incompatibility, increasing endogamy in facultative apomicts (especially sporophytic apomicts) and in sexuals (Otto & Whitton 2000, Mendes-Rodrigues 2010, Husband *et al.* 2008).

The Brazilian Cerrado is the second largest bioma in Neotropics, and was indicated as a "hot spot" for conservation since less than 50% of its original area still exist (Myers et al., 2000). It is the largest continuous Neotropical savanna area, presenting a mosaic of plant formations with scattered trees on a grass matrix, under a markedly seasonal climate, with dry winter and summer rains (Ribeiro & Walter, 2008). Recurrent fire events have driven the evolution of different angiosperm groups in the area (Simon et al. 2009). The Cerrado supports notable plant diversity (Ratter et al. 1997), resulted from local diversification and speciation, and to what extent polyploidy may have been involved in those process remains an open question (Forni-Martins & Martins, 2000). Polyploidy has been reported for some Cerrado groups and apparently is associated with the extreme environmental conditions of this biome (Morawetz 1986).

The subfamily Bombacoideae (Malvaceae) includes tropical trees that are considered mostly paleopolyploid, with small and numerous chromosomes (Morawetz 1986; Gibbs et al. 1988, Baum & Oginuma, 1994). The Bombacoideae include, with a few exceptions, all genera formerly placed in the Bombacaceae (Baum et al. 2004, Duarte et al. 2011). Molecular analyses

(Baum et al. 2004, Duarte et al. 2011) confirmed the monophyly of the Malvoideae and Bombacoideae, which are included in the clade Malvatheca, clearly distinguished from the other groups in the broad definition of Malvaceae.

Polyploidy is common in the Bombacoideae and polyploid series seems to characterize some genera, such as *Adansonia* (Miège 1974), the baobab trees in Africa and Madagascar. These trees present up to $2n=160$ chromosomes and species may be distinguished by their chromosome number, although subsequent studies showed some of the counts may be hindered by methodological problems and suggest more conservative and less variable numbers (Baum & Oginuma 1994). In Brazil, even higher chromosome numbers were described for *Eriotheca* (Bombacoideae) trees that are common in Cerrado (Mendonça et al., 1998). *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl is polyploidy with up to $2n=276$ (Maglio et al. 1984, Forni-Martins et al. 1995, Oliveira et al. 1992, Mendes-Rodrigues et al. 2005) while *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns is mostly diploid but with relatively high chromosome numbers ($2n=92$ e 270 ; Maglio et al. 1984, Forni-Martins et al. 1995, Oliveira et al. 1992). However, some variation on counts have been observed and no other method has been used to assess genome size or further detail on the chromosome evolution of this group.

These high chromosome numbers and polyploid series in the Bombacoideae have not been taken into account in the phylogenetic reconstructions for the Malvaceae. The present study contributes with new chromosome counts for some Cerrado Bombacoideae species and populations, validated in some cases by flow cytometry information, and review the chromosome numbers for the Malvaceae *sensu lato*, comparing the subfamilies and putative phylogenetic relations between groups.

Material and Methods

Studied materials

We studied the chromosome number for six Cerrado Bombacoideae species: *Eriotheca candolleana* (K. Schum.) A. Robyns, *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns, *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl, *Pachira glabra* Pasq., *Pseudobombax longiflorum* (Mart. & Zucc.) A. Robyns and *Pseudobombax tomentosum* (Mart. & Zucc.) Robyns from seeds collected in Minas Gerais (MG) and Goiás (GO).

Seeds of *Pachira glabra*, *E. candolleana*, *Pseudobombax longiflorum* and *Pseudobombax tomentosum* (were collected along the road between Uberlândia-MG and Belo Horizonte-MG (BR452 - BR262). Polyembryonic seeds of *E. pubescens* were collected along the road from Uberlândia-MG to Brasília-DF (BR050) and also in Caldas Novas-GO, whilst monoembryonic seeds in the region of Cristalina-GO. Polyembryonic seeds of *E. gracilipes* were collected in Caldas Novas-GO and monoembryonic ones were collected in Uberlândia-MG. Moreover, since *Eriotheca* species show breeding system variation, given rise to polyembryonic or monoembryonic seeds (see details in Mendes-Rodrigues 2010), we collected seeds from each population to examine the relationship between polyembryony and chromosome number. Voucher material of the plants were deposited in the Herbarium Uberlandensis (HUFU) of the Universidade Federal de Uberlândia (*E. pubescens*, monoembryonic individuals - HUFU 50731; *E. pubescens*, polyembryonic individuals - HUFU 25854; *E. gracilipes*, monoembryonic individuals -HUFU 25856; *E. gracilipes*, polyembryonic individuals -HUFU 50733; *E. candolleana*, HUFU 50730; *P. glabra*, HUFU52182; *P.longiflorum*, C. M. Rodrigues 75).

Cytogenetic analysis

The seeds were germinated on vermiculite in plastic boxes, watered as necessary. The radicles were pre-treated either in a saturated solution of paradichlorobenzene (PDB) for 4h at 16 - 18°C, or 0,009 mM 8- hydroxyquinoline (8-hq) for 4h at 16 – 18°C or for 24 h at 4°C. After the pre-treatment, the

radicles were fixed in Carnoy (3:1 ethanol/acetic acid v/v) for at least 24 hours at room temperature and stored in 70% ethanol at -20°C for analysis. Root meristems were rinsed three times for five minutes in distilled water, softened in HCl 5N for 20 minutes and rinsed again three times in distilled water. The meristems were squashed in slides in 45% acetic acid to spread the cells. The slides were then frozen in liquid nitrogen in order to remove the coverslip, stained with 2% Giemsa (Guerra 1983) and then sealed with Entellan[®]. The slides were observed using an Olympus BX 51 microscope and at least 20 metaphase cells were used for chromosome counting in each species. Chromosome counts were carried out for each individual sampled in order to identify possible cytotypes in the species or population. The best metaphase plates were recorded using an Olympus DP70 digital camera.

The nuclear DNA content of 124 individuals (seedlings) was determined by flow cytometry. We used between 5-7 trees producing polyembryonic and monoembryonic seeds and 25-37 seedlings from each tree. For *Eriotheca gracilipes*, seeds were collected from a polyembryonic population of Caldas Novas-GO and from a monoembryonic population of Uberlândia-MG. For *Eriotheca pubescens*, seeds from both polyembryonic and monoembryonic trees were collected in Cristalina-GO. Fresh leaf material from one to two months old seedlings grown in greenhouse was used.

Nuclear suspensions for flow cytometry measurements were prepared following the protocol adapted from Dolezel et al. (1989). Approximately 25-50 mg of leaf tissue were chopped with a razor blade onto a Petri dish (kept on ice) containing 1 mL of LB01 buffer. The resulting suspension was kept on ice by about 5-10 minutes and after that 0.5 to 1.5 mL of the buffer was added to improve fluidity. Afterwards, the solution was filtered through a 30-mm mesh CellTric disposable filter (Partec GmbH, Münster, Germany), and mixed with 50 µL of propidium iodide (50 µg/mL) and 50 µL of RNase (50 µg/mL). The quality and the number of nucleus were dependent of solution fluidity. The leaves of *Eriotheca* produce a lot of gelatinous mucilage on cutting, which made it difficult to filter the material and apparently decreased the quality and number of nuclei obtained. For this reason, it was necessary to add more buffer before filtering. Until analysis, samples were kept on ice and protected from light. Flow

cytometry measurements were taken using a Coulter CYTOMICS FC500-MPL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with a 20-mW argon-ion laser at 488 nm. For each sample we made 2-5 measurements depending on seedling size. In polyembryonic seeds that produced more than one seedling, we selected and measured only one seedling per seed.

We used *Pisum sativum* 'Ctirad', a taxon with 9.09 pg of 2C nuclear DNA (Dolezel et al. 1998) as primary internal standard, and for some samples we also used *Zea mays* 'CE 777', with 5.43 pg of 2C nuclear DNA (Lysak & Dolezel 1998). In the hexaploid material peaks overlapped, and so we used tetraploid specimens of *Dianthus broteri* as a secondary standard (Balao et al. 2009) which was re-calibrated against *P. sativum*. The 2C genome size for these tetraploid specimen was recalculated to DB 336/06 ($n = 14$; mean $\pm$ SE = 3.52 ± 0.02 pg; CV = 2.37%); to DB 236/06 3 ($n = 13$; mean $\pm$ SE = 3.61 ± 0.01 pg; CV = 2.38 %), to DB 236/06 1 ($n = 13$; mean $\pm$ SE = 3.60 ± 0.01 pg; CV = 2.52%) and to DB263/07 3 ($n = 13$; mean $\pm$ SE = 3.17 ± 0.01 pg; CV = 1.72%). The replicate measurements were performed on different days for all analyses. Peak means were established through manual gating using software WinMDI 2.9 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Overall, 399 flow cytometry measurements were performed. All measurements were used for analyses (i.e. within-plant extreme values were not dismissed; we found a variation among 2-11% from mean). Absolute DNA content was calculated for each pattern, tree and seedling. Monoploid genome size (1Cx) was estimated as the amount of nuclear DNA divided by ploidy level, based in 2C mean value to each seedling.

The compilation of the chromosome numbers in the Malvaceae s.l. was carried out using chromosome data available in literature and compiled in the Index to Plant Chromosome Numbers (<http://www.tropicos.org/Project/IPCN>). We verified the original literature to avoid inconsistent data. Mean chromosome number were obtained for each subfamily (sensu Baum et al. 2004 and Duarte et al. 2011).

Statistical analyses

Chromosome classes of frequency to cytotype counts to Bombacoideae and Malvoideae were constructed using Sturges algorithm (Sturges 1926). Differences of the accumulated frequency of smaller and larger classes of chromosome numbers were evaluated by Kolmogorov-Smirnov (D) test (Sokal & Rohlf 1981). All data were analyzed using generalized linear models. The mean chromosome numbers were analyzed using Poisson loglinear distribution; the 2C and 1Cx DNA and the coefficient of variation (scale response) using normal linear functions (Crawley 2007). All these analyses were conducted using GLZM module of SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) with Type III test. The means were compared pairwise with least significant difference test.

Results

Some of the metaphasic plates analyzed for species of the genera *Eriotheca*, *Pachira* and *Pseudobombax*, are presented in Figure 1. A general list including both the original results (Table 1) and those compiled from literature are presented as complementary material (Appendix I). The data included all chromosome numbers available for the Malvaceae s.l.

For the original data presented here (Figure 1), the chromosome number for *Pseudobombax tomentosum*, *Eriotheca candolleana* and new cytotypes to *Eriotheca gracilipes* and *Eriotheca pubescens* which were not previously described, represented novelties at species level. The other counts confirmed previous studies but we found.

We compiled chromosome numbers for 568 species in 103 genera for the Malvaceae s.l. of a total of ca. 230 genera and 2330 species, including 37 species in 11 genera for the Bombacoideae of a total of ca. 18 genera and 187 species (Bayer & Kubitzki 2003). Recent molecular analyses recognize 16 genera for the Bombacoideae, with the inclusion of *Ochroma* and *Patinoa* still under discussion (Baum *et al* 2004; Duarte 2010, Duarte *et al* 2011). Based on these studies, the species compilation would represent ca. 19% of the species in the subfamily Bombacoideae and 24% in Malvaceae.

The chromosomes of all species of Bombacoideae are numerous and small which make counting time-consuming and difficult. The lowest numbers were found in *Bombax insignis* ($2n=18$), endemic in India, and *Pachira macrocarpa* (Schltdl. & Cham.) Walp ($2n=26$) from China. The highest numbers were recorded for the *Eriotheca* species of Brazilian Cerrado studied here, with up to 276 chromosomes. There were clear differences in the mean chromosome numbers between some of the subfamilies, the lowest numbers found for the Helicterioideae, Byttnerioideae and Grewioideae (same mean value) and the highest for the Tilioideae (Figure 2). The Malvoideae and Bombacoideae, which together compose the Malvotheca clade, presented clearly distinct chromosome number frequencies based in Kolmogorov-Smirnov test ($D = 0.1923$, $P < 0.05$, Figure 3).

The flow cytometry analyses showed interesting results for species and populations of *Eriotheca* (Table 1). The number of nuclei measured by sample was relatively low but variation was also small and the results were consistent. The basic 1C DNA was similar between species and cytotypes, confirmed chromosome counts and supported the idea that populations are of polyploid origin.

Discussion

According to the model for chromosome evolution in the Angiosperms (Masterson 1994), which considers all species with $n \geq 11$ chromosomes as polyploid, 70% of the Malvaceae and 97% of the Bombacoideae would be polyploids (Table 2). The data here confirmed that the Bombacoideae is highly polyploid (Baum & Oginuma, 1994) and most plants in the subfamily showed chromosome numbers which are roughly the double of the numbers those observed for the Malvoideae subfamily, the sister group in the Malvatheca clade. Actually, with the exception of a single species of Tilioideae, recorded with a surprisingly high chromosome number ($2n = 164$ e 328), the Bombacoideae stands clearly above the chromosome number for the family. Surprisingly, the recent molecular and taxonomic studies did not consider this cytological data.

In our survey, *Bombax insigne* is the only non-polyploid species, with $2n=18$ (Sinha & Mazumdar 1993) together with *Pachira macrocarpa* with $2n=26$ chromosomes (Chen *et al.* 2003). These two numbers are unusual in an otherwise highly polyploidy group but we have not access to the original papers to see details of the studies. The number obtained to *Pachira macrocarpa* is similar to that recorded for most species of *Gossypium* (Malvoideae) studied so far, which present $2n=26$ chromosomes (<http://www.tropicos.org/Name/40016700?projectid=9>). Most of the Malvoideae present chromosome numbers half or lower than those found for the Bombacoideae, indicating that the origin of these latter taxa is possibly linked to a whole genome duplication - WGD event.

The chromosome number $2n=86$ ($n=43$) seems to predominate in many Bombacoideae genera. Most of the large tropical *Ceiba* trees, except for *C. pentandra* with $2n=88$ ($n=44$) chromosomes (Gill *et al.* 1979), have this number. This $2n = 88$ appear also in some species of other genera, such as *Spirotheca rosea*, *Adansonia grandidieri*, *Adansonia za*, *Pachira glabra*, *Pachira aquatica*, *Pseudobombax longiflorum* and *Pseudobombax tomentosum*. Slightly lower numbers appear in *Adansonia madagascariensis* and *Ceiba speciosa* with $2n=80-84$. These may represent aneuploid variations or simply errors due to the analytical problems posed by such numerous small chromosomes. Analytical mistakes or even misidentification were common in early cytological studies and may hinder cytotaxonomic interpretation. Occasional odd numbers with no clear link to a polyploid series, as observed for some species of *Adansonia*, such as *A. digitata*, *A. grandidieri*, and *A. gregorii*, were viewed as analytical mistakes due the small size of the chromosomes in the group according Baum & Oginuma (1994). However, the results presented here for the Neotropical *Eriotheca* suggest such variant counts may be the result of cytotypic variation.

The different cytotypes in the two *Eriotheca* species may be interpreted as an incomplete polyploid series. The basic number proposed for the genus *Eriotheca* is $x=46$ chromosomes (Forni-Martins *et al.* 1995), so that it is possible to view the *E. pubescens* cytotypes as $2n=3x=138$, $2n=4x=184$ e $2n=6x=276$ chromosomes. For *E. gracilipes* the recorded numbers were consistently $2n=2x=92$ (Oliveira *et al.* 1992, Forni-Martins *et al.* 1995). A report of $2n= 270$

for *E. gracilipes* (Morawetz 1986) was interpreted as a misidentification of an *E. pubescens* cytotype (Oliveira *et al.* 1992), but our survey suggests that this count was probably correct since individuals of *E. gracilipes* studied here showed $2n=2x=92$ and $2n=6x=276$ chromosomes. Flow cytometry results support this interpretation since basic 1C DNA was similar between all *Eriotheca* species and cytotypes.

According to our sampling, the putative hexaploid cytotype in *E. pubescens* is widely distributed, whilst the tetraploid cytotype $2n=4x=184$ chromosomes is restricted to a single population in Cristalina, Goiás state. The opposite occurs in *E. gracilipes*, for which hexaploid individuals were found only in a relatively limited area in Caldas Novas-Goiás (Mendes-Rodrigues 2010).

The two triploid individuals among the tetraploid population of *E. pubescens* may be part of ploidy variation in the group. Triploids are usually less fertile due to irregular meiosis, producing aneuploid gametes resulting from chromosome pairing and segregation (Otto & Whitton, 2000). It is possible that these triploids may have arisen from hybridization between tetraploid and diploid cytotypes, but diploid individuals have not been observed in *E. pubescens* yet.

Higher ploidy levels, as with the hexaploid *E. gracilipes* and *E. pubescens* cytotypes, may arise from reduced ($2n$) and unreduced ($4n$) gametes (Ramsey & Schemske 1998). Environmental factors such as temperature, herbivory and low nutrient availability, as observed in the Cerrado, may influence production of unreduced pollen and explain the origin of these highly polyploid individuals (Ramsey & Schemske 1998). These highly polyploid cytotypes are associated with apomixis and polyembryony, which may have favored the distribution and adaptability of *E. pubescens* (Oliveira, *et al.* 1992, Mendes-Rodrigues *et al.* 2005, Mendes-Rodrigues 2010).

These polyploidy series indicate recent events or Neopolyploidy. Recent polyploidization events are less studied and involve cytotype formation and demographic establishment (Ramsey & Schemske 2002). Neopolyploids may have mutations or special gene combinations that are fixed in these populations even when phenotypic changes are small and such genotypes may confer advantages to these individuals. Apomixis and polyembryony may be viewed as advantageous traits since they allow greater reproductive assurance (e.g.

Santos et al. 2012). These traits may have conferred adaptive ability to habitats different than those occupied by diploids (Otto & Whitton 2000; Ramsey & Schemske 1998).

Chromosome numbers may also help to understand phylogenetic relationships. Recent molecular analyses of the Bombacoideae (Duarte et al. 2011) confirm its monophyly and suggest a division in three clades, the first with the genera *Huberodendron*, *Gyranthera* and *Bernoullia*, the second with *Adansonia*, *Catostemma*, *Cavanillesia* and *Scleronema* and the third with *Rhodognaphalon*, *Spirotheca*, *Bombax*, *Pachira-Eriotheca*, *Pseudobombax*, *Ceiba* and *Neobuchia*. In spite of the an affinity between *Eriotheca* and *Pachira* in the third clade, the chromosome numbers presented here do not support this relationship. Because the variable cytotypes in *Eriotheca* are novelties and polyploidy may have an impact on the genes used in phylogenetic reconstruction (Duarte et al 2011), it may be necessary to reassess which plants/populations were used in their work, addressing the implications of the polyploid series we found in the phylogeny of the group.

It is also arguable the inclusion of *Ochroma* e *Patinoa* in the Bombacoideae. Based on the molecular analysis, these genera fall between the Bombacoideae and the Malvoideae (Duarte et al. 2011). However, reports for chromosome numbers in *Ochroma pyramidale* are $2n=2x=78$, 88 and 90. Although variable, these numbers are similar those described for Bombacoideae and much higher than those described for the Malvoideae, thus providing some support for the inclusion of *Ochroma* in the Bombacoideae.

Based on the phylogeny and chromosome counts, it is possible to define two basic chromosome numbers for the Bombacoideae. The numbers $x=44$ and 46 were found commonly among the species and explain most ploidy variation observed for the group. These and other numbers are possibly due to aneuploidy, with loss or gain of one or a few chromosomes in the basic genome, resulting in $2n = 72, 86, 96, 160$. In any case, these number are much higher than the ones sported by the species in the Malvoideae and support the Bombacoideae as a stand alone group.

Acknowledgements

We thank Diana Salles Sampaio and the colleagues in the LAMOVl and LABGEN for their support during the study.

The work was carried out under a research grant from FAPEMIG (CRA 1115/09). Flow cytometry analyses were carried out in Seville during the Clesnan Mendes Rodrigues post-doctoral, funded a CAPES-DGU cooperation program as a part of a Proyecto Hispano-Brasileño de Cooperación Interuniversitaria (PHB2010-0026-PC).

References

- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society** 161: 105-121.
- ALVERSON, W.S.; WHITLOCK, B.A.; NYFFELER, R.; BAYER, C.; BAUM, D.A. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhf* sequence data. **American Journal of Botany**, 10: 1474-1486.
- BAYER, C.; FAY, M.F., DE BRUIJN, A.Y., SAVOLAINEN, V., MORTON, C.M., KUBITZKI, K., ALVERSON, W.S., CHASE, M.W. 1999. Support for an expanded family concept of Malvaceae within a recircumscribed order Malvales: a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* DNA sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society** 129: 267-303.
- BALAO, F.; CASIMIRO-SORIGUER, R.; TALAVERA, M.; HERRERA, J.; TALAVERA, S. 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. **Annals of Botany** 104: 965- 973.
- BAUM, D. A.; OGINUMA, K. 1994. A review of chromosome numbers in bombacaceae with new counts for *Adansonia*. **Taxon** 43: 11-20.
- BAUM, D.A., SMALL, R.L.; WENDEL, J.F. 1998. Biogeography and floral evolution of baobabs (*Adansonia*, Bombacaceae) as inferred from multiple data sets. **Systematic Biology** 47:181–207.
- BAUM, D. A.; SMITH, S. D.; YEN, A.; ALVERSON, W.S.; NYFFELER, R.; WHITLOCK, B.A.; OLDHAM, R.L. 2004. Phylogenetic Relationships of Malvatheca (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae Sensus Lato) as inferred from plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** 91:1863-1871.
- BAYER, C.; KUBITZKI, K. 2003. Malvaceae. In KUBITZKI, K. and BAYER, C. (eds.) **The families and genera of vascular plants**, Germany: Springer 225–311.
- BICKNELL, R. A.; KOLTUNOW, A. M. 2004. Understanding apomixis: Recent advances and remaining conundrums. **The Plant Cell** 16: 228-246.

- CARMAN, J. G. 1997. Asynchronous expression of duplicate genes in Angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. **Biological Journal of the Linnean Society** 61:51-94.
- CHEN, R. Y.; SONG, W. Q.; LI, X. L.; LI, M. X.; LIANG, G. L.; Chen, C. B. 2003. **Chromosome atlas of major economic plants genome in China. Chromosome atlas of garden flowering plants in China.** Science Press.
- CHEEK, M.W. 2007. Bombacaceae. In Heywood, V. H, Brummitt, R. K., Culham, A. & Seberg, O (eds.). **Flowering plant families of the World.** Firefly Books, Ontario.
- CRAWLEY M. J. 2007. The R Book. Chichester: John Wiley & Sons, 942 pp.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. 1989. Analysis of nuclear-DNA content in plant-cells by flow-cytometry. **Biologia Plantarum** 31:113–120.
- DUARTE, M. C. 2010. **Análise filogenética de *Eriotheca* Schott & Endl . e gêneros afins (Bombacoideae, Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil São Paulo.** Tese de doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- DUARTE, M.C.; ESTEVES, G.L.; SALATINO, M.L.F.; WALSH, K.C.; BAUM, D.A 2011. Phylogenetic analyses of *Eriotheca* and related genera (Bombacoideae, Malvaceae). **Systematic Botany** 36:690–701.
- EHRENDORFER, F. 1970. Evolutionary patterns and strategies in seed plants. **Taxon** 19:185-195.
- FIRETTI-LEGGIERI, F.; LOHMANN, L.G.; ALCANTRA, S.; COSTA, I.R.; SEMIR, J. 2013. Polyploidy and polyembryony in *Anemopaegma* (Bignoniaceae, Bignoniaceae). **Plant Reproduction** 35:43-53.
- FORNI-MARTINS, ELIANA R; PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. 1995. Chromosome numbers in Brazilian cerrado plants. **Revista Brasileira de Genética** 18: 281-288.
- FORNI-MARTINS, E. R.; MARTINS, F. R. 2000. Chromosome studies on Brazilian Cerrado plants. **Genetics and Molecular Biology** 23:947-955.
- GIBBS, P.E.; SEMIR, J.; CRUZ, N.D. 1988. The proposal to unite the genera *Chorisia* Kunth and *Ceiba* Miller (Bombacaceae). **Notes Royal Botanical Garden Edinburgh** 45:125-136.

- GILL,B.S.;BIR,S; SINGHAL,V.K. 1979. In IOPB chromosome number reports LXV. **Taxon** 28:630.
- GRANT S. 1963. **The Origin of Adaptations**. New York: Columbia University Press.
- GUERRA, M. 1983. **Introdução a citogenética geral**. ed.1, Rio de Janeiro: Guanabara.
- GUERRA, M. 1990. A situação da citotaxonomia de angiospermas. **Acta Botânica Brasilica** 4:75-86.
- GUERRA, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and genome research** 120:339-50.
- HÖRANDL, E. 2010.The evolution of self-fertility in apomictic plants.**Sexual plant reproduction** 23:73-86.
- HUSBAND, B. C.; OZIMEC, B.; MARTIN, S. L.; POLLOCK, L. 2008. Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: Current trends and insights from synthetic polyploids. **International Journal of Plant Sciences** 169:195-206.
- LYSAK, M.A.; DOLEZEL,J.1998. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). **Caryologia** 51:123-132.
- MAGLIO, C.A.F.P., FORNI-MARTINS, E.R.; CRUZ, N.D. 1984. IOPB Chromosome number reports LXXXIV. **Taxon** 33:536.
- MASTERSON, J. 1994. Stomatal Size in Fossil Plants: Evidence for polyploidy in Majority of Angiosperms. **Science** 264:421-423.
- MAYROSE, Y. ZHAN, S.H.; ROTHFELS, C.J.; MAGNUSON-FORD, K.; BARKER, M.S.; RIESEBERG, L.H.; OTTO, S.P. 2011. Recently Formed Polyploid Plants, Diversify at Lower Rates. **Science** 333:1257.
- MENDES-RODRIGUES, C.; CARMO-OLIVEIRA, R.; TALAVERA, S; ARTISTA, M.; ORTIZ, P.L.; OLIVEIRA, P.E.2005. Polyembryony and apomixis in *Eriotheca pubescens* (Malvaceae - Bombacoideae). **Plant Biology** 7:533-540.
- MENDES-RODRIGUES, C. 2010. **Ecologia de espécies poliembriônicas com ênfase no Bioma Cerrado**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- MENDES-RODRIGUES, C.; OLIVEIRA, P. E. 2012. Polyembryony in Melastomataceae from Brazilian Cerrado: multiple embryos in a small world. **Plant Biology** 14:845-853.
- MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M; WALTER, B.M.T.; SILVA-JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIR, P.E. 1998. Flora vascular do Cerrado. In: M.S; S.P. Almeida (EDS). **Cerrado: ambiente e flora**. Brasília:Embrapa - CPAC p. 287-556.
- MIÈGE, J. 1974. Etude du genre *Adansonia* L.I. Caryologie et Blastogenèse. **Candollea** 29:457-475.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853-858.
- MORAWETZ, W. 1986. Remarks on kariological differentiation patterns in tropical woody plants. **Plant Systematics and Evolution** 152:49-100.
- OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E.; BARBOSA, A.A.; TALAVERA, S. 1992. Contrasting breeding system in two *Eriotheca* (Bombacaceae) species of the Brazilian cerrados. **Plant Systematics and Evolution** 179:207-219.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review Genetic** 34:401-437.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. 1997. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** 80:223-230.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, D. W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics** 29:467-501.
- RIBEIRO, J.F. e WALTER, B.M.T. 2008. As principais fitofisionomias de Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. DE; Ribeiro, J.F. **Cerrado: ecologia e flora**. Embrapa Cerrados. Brasília-DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- SAMPAIO, D.S. 2010. **Biologia reprodutiva de espécies de Bignoniaceae ocorrentes no Cerrado e variações no sistema de autoincompatibilidade**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- SANTOS, A.P.M., FRACASSO, C.M., SANTOS, M.L., ROMERO, R., SAZIMA, M. & OLIVEIRA, P.E. 2012. Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. **Annals of Botany** 110 (3): 667-679
- SIMON, M. F., R. GREYER, L. P. DE QUEIROZ, C. SKEMA, R. T. PENNINGTON, & C. E. HUGHES. 2009. Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by *in situ* evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 106: 20359-20364.
- SINHA, A. R. P.; MAZUMDAR, L. R. 1993. New chromosome counts of an endemic species of Andamans. **Broteria Genetica** 14:157–160.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1981. **Biometry**. New York, W. H. Freeman and Company.
- SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 7050-7057.
- SOLTIS D.E.; ALBERT V.A.; LEEBENS-MACK J.; BELL C.D.; PATERSON A.H.; ZHENG C.; SANKOFF D., PAMPHILIS C.W.; WALL P.K.; SOLTIS P.S. 2009. Polyploidy and Angiosperm diversification. **American Journal of Botany** 96:336-348.
- STURGES H. 1926. The choice of a class-interval. **Journal of the American Statistical Association**, 21, 65-66.
- TROPICOS. Org. **Missouri Botanical Garden**. Available at: <http://www.tropicos.org>. 15th June 2012.

Table 1. Chromosome numbers for some Cerrado region Bombacoideae. Embryonic patterns (monoembryonic and polyembryonic) from Mendes-Rodrigues (2005).

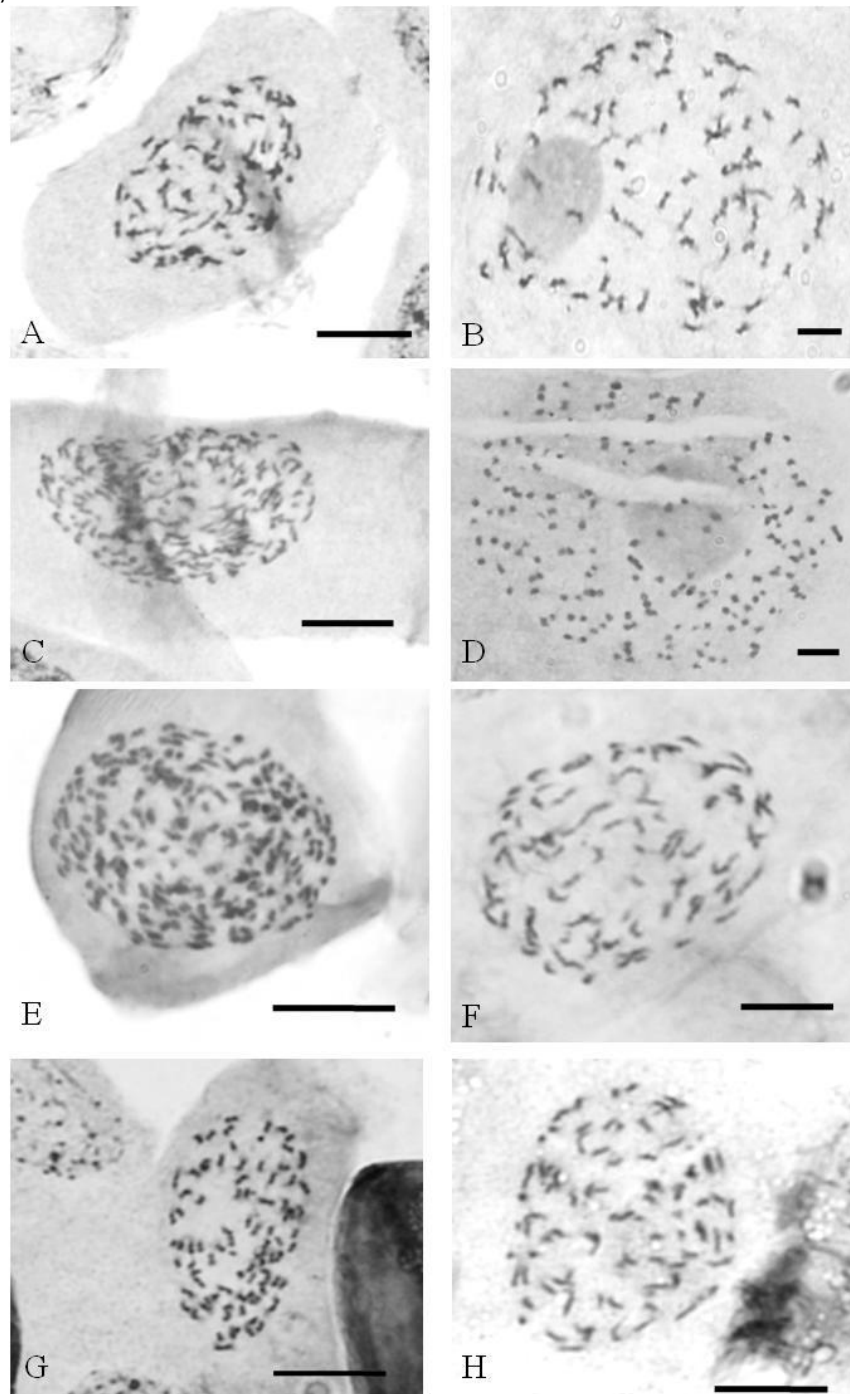
Species	Embryony pattern	Sampled individuals	Counted Cells	Progenies studied	2n
<i>Pachira glabra</i>	Poly	1	20	6	88
<i>Eriotheca candolleana</i>	Mono	2	20	2	92
<i>Eriotheca gracilipes</i>	Mono	3	20	5	92
	Poly	5	25	11	276
<i>Eriotheca pubescens</i>	Mono	2	16	7	138
		1	2	1	184
		4	27	10	184
		2	8	2	184
	Poly	5	22	12	276
<i>Pseudobombax longiflorum</i>	Mono	3	22	8	88
<i>Pseudobombax tomentosum</i>	Mono	6	20	10	88

Table 2. Estimative Genome size of *Eriotheca gracilipes* and *E. pubescens* (Malvaceae, Bombacoideae) with different embryonic patterns (monoembryonic and polyembryonic). Values are mean±standard error.

		<i>Eriotheca gracilipes</i>		<i>Eriotheca pubescens</i>	
		Mono	Poly	Mono	Poly
Trees sampled (N)		5	5	7	5
Seedlings sampled (N)		25	36	37	26
Repetition		86	107	120	86
2CxDNA(pg)		3.68±0.01 ^d	10.48±0.09 ^a	6.91±0.01 ^c	10.23±0.02 ^b
1CxDNA(pg)		1.84±0.004 ^a	1.75±0.01 ^a	1.73±0.003 ^a	1.70±0.003 ^a
Nuclei per repetition		1160.21±107.5	995.79±60.8	1898.39±101.2	925.14±54.9
Coefficient of variation (%)		3.10±0.08 ^b	3.62±0.08 ^a	2.31±0.07 ^c	2.75±0.09 ^c

Statistical results (Wald qui-square, df, p) to 2C DNA Pattern (2270,67, 3, 0.001), Tree (Pattern) (12.75, 12, 0.387) and Seedling(Tree) (1.56, 48, 1.000), to 1Cx DNA Pattern (0.270, 3, 0.996), Tree (Pattern) (0.259, 18, 1.000), to Coefficient of variation Pattern (71.77, 3, <0.001), Tree (Pattern) (50.68, 12, <0.001) and Seedling (Tree) (25.94, 48, 0.996). Means followed by different letters differs based in Least Significant Difference ($p<0.05$)

Figure 1: Mitotic metaphasic plates from root meristem cells of Bombacoideae (Malvaceae) species of the Brazilian Cerrados. A: *Eriotheca candoleana* $2n=2x=92$; B: *Eriotheca gracilipes* $2n=2x=92$ (Uberlândia-MG); C: *Eriotheca gracilipes* $2n=6x=276$ (Caldas Novas-GO); D: *Eriotheca pubescens* $2n=4x=184$ (Cristalina-GO); E: *Eriotheca pubescens* $2n=6x=276$ (Rodovia BR 050 and Caldas Novas-GO); F: *Pachira glabra* $2n=2x=88$; G: *Pseudobombax longiflorum* $2n=2x=88$; H: *Pseudobombax tomentosum* $2n=2x=88$. Scale bar = 10 μm .



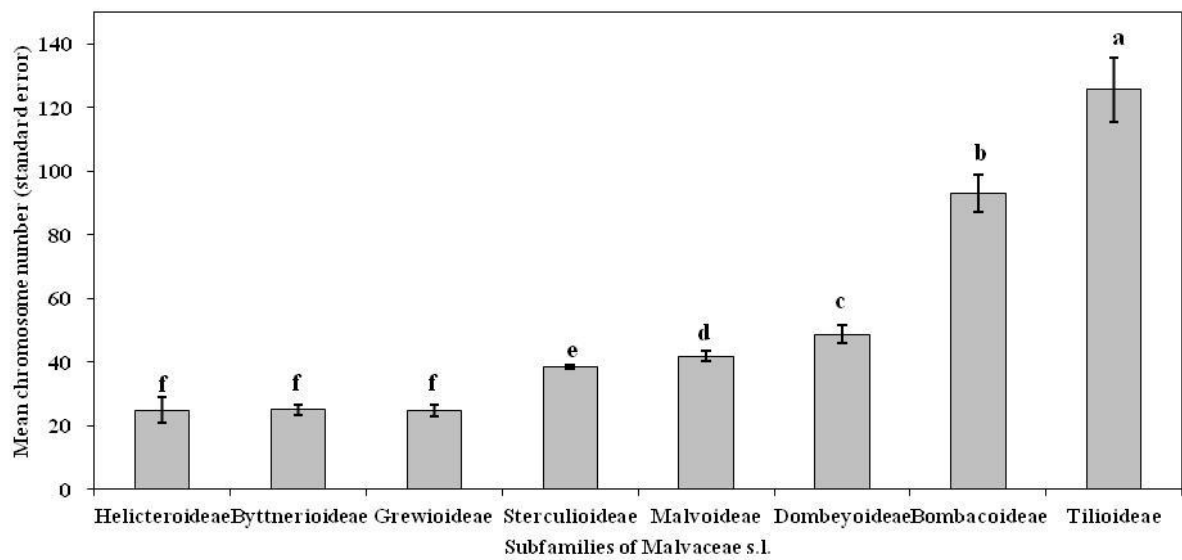


Figure 2. Mean chromosome number (and standard error) in each subfamily of Malvaceae s.l. The subfamilies means show statistical differences based in Wald Chi-Square test (7111.51, df = 7, $p < 0.001$), and means followed by different letters show differences based in Least Significant Difference.

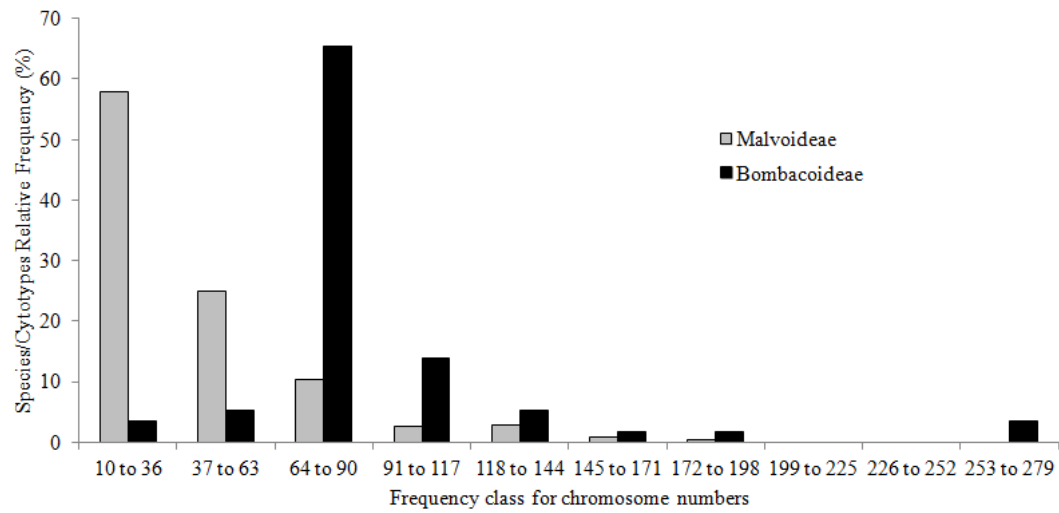


Figure 3. Frequency of species or cytotypes with different chromosome counts (2n) in the subfamilies Malvoideae and Bombacoideae (Malvaceae s.l.).

Appendix 1. List of chromosome numbers for Malvaceae s.l. compiled from the Index of Plant Chromosome Numbers and including the original counts presented here.

Subfamily	Genera	Species	2n	Reference
Bombacoideae	<i>Adansonia</i>	<i>A. digitata</i> L.	144	Miège (1974)
			160	Baum; Oginuma (1994)
		<i>A. grandidieri</i> Baill.	60-64	Miège (1974)
			88	Baum; Oginuma (1994)
		<i>A. za</i> Baill.	88	Baum; Oginuma (1994)
		<i>A. gregorii</i> F. Muell	72	Baker; Baker (1968)
			88	Baum; Oginuma (1994)
			96	Miège (1974)
		<i>A. madagascariensis</i> Baill.	80-84	Miège (1974)
			88	Baum; Oginuma (1994)
		<i>A. perrieri</i> Capuron	88	Baum; Oginuma (1994)
			96	Miège (1974)
		<i>A. suarezensis</i> H. Perrier	72	Miège (1974)
			88	Baum; Oginuma (1994)
		<i>A. rubrostipa</i> Jum. & H. Perrier	72	Miège (1974)
			88	Baum; Oginuma (1994)
	<i>Bombax</i>	<i>B. buonopozense</i> P. Beauv.	72	Baker; Baker (1968)
			96	Mangenot; Magenot (1958, 1962)
		<i>B. ceiba</i> L.	92	Singhal; Gill (1984)
			46	Mehra (1976)
		<i>B. costatum</i> Pellegr. & Vuill	72	Baker; Baker (1968)
		<i>B. insigne</i> Wall.	18	Sinha; Mazumdar (1993)

<i>Cavanillesia</i>	<i>C. plantanifolia</i> (Bonpl.) Kunth	72	Baker; Baker (1968)
<i>Ceiba</i>	<i>C. pentandra</i> (L.) Gaertn.	88	Gill, et al. (1979)
		86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. speciosa</i> (St.-Hill.) Ravenna	86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. erianthos</i> (Cav.) K. Schum.	86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. glaziovii</i> (Kuntze) K. Schum.	86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. insignis</i> (Kunth) P.E. Gibbs & Semir	86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. jasminodora</i> (A. St.-Hil.) K. Schum.	86	Gibbs, et al. (1988)
	<i>C. pubiflora</i> (A. St.- Hil.) K. Schum.	86	Gibbs, et al. (1988)
<i>Eriotheca</i>	<i>E. gracilipes</i>	96	Maglio, et al. (1984)
		92	Forni-Martins, et al. (1995)
		210	Morawetz (1986)
		92- 276	Este estudo
	<i>E. candoleana</i>	92	Este estudo
	<i>E. pubescens</i>	270	Maglio, et al. (1984)
		ca. 270	Forni-Martins, et al. (1995)
		276	Oliveira et al. (1992)
		138	Este estudo
		184	Este estudo
		276	Este estudo
<i>Gyranthera</i>	<i>G. caribensis</i> Pittier	96	Oginuma, et al. (1999)
<i>Ochroma</i>	<i>O. pyramidale</i> (Cav. Ex Lam.) Urb.	78	Baker; Baker (1968)

			88	Baker; Baker (1968)
			90	Bawa (1973)
<i>Pachira</i>	<i>P. glabra</i> Pasq.	72	Baker (1960)	
		88	Mangenot; Magenot (1962)	
		88	Este estudo	
	<i>P. aquatica</i> Aubl.	88	Sarkar, et al. (1975)	
		44	Sarkar, et al. (1975)	
	<i>P. macrocarpa</i> (Schltdl. & Cham.) Walp.	26	Chen, et al. (2003)	
	<i>P. quinata</i> (Jacq.)Alverson	72	Baker; Baker (1968)	
		92	Bawa (1973)	
	<i>P. sessilis</i> Benth.	72	Baker; Baker (1968)	
<i>Pseudobombax</i>	<i>P. tomentosum</i>	88	Este estudo	
	<i>P. longiflorum</i>	88	Gibbs, et al. (1988)	
		88	Este estudo	
	<i>P. munguba</i> (Mart. et Zucc.) Dugand.	ca. 84	Morawetz (1986)	
	<i>P. ellipticum</i> (K. Kunth) A. Dugand	72	Baker; Baker (1968)	
		88	Baker; Baker (1968)	
	<i>P. septenatum</i> (Jacq.) Dugand.	88	Bawa (1973)	
<i>Rhodognaphalon</i>	<i>R.</i> <i>brevicuspe</i> (Sprague) A.Roberty	144	Miège (1974)	
		ca 150	Mangenot; Magenot (1957, 1962)	
<i>Spirotheca</i>	<i>S. rosea</i> (Seem.) Gibbs & Alverson	88	Oginuma, et al. (1999)	
Byttnerioideae	<i>Abroma</i>	<i>A. augustum</i> (L.) L. f.	22	Sarkar, A. K., N. DATTA & U. Chatterjee. 1972.
			20	Chatterjee, U. 1969.

		16	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Ambroma</i>	<i>A. augustum</i> (L.) L. f.	16	Gu, Z. & H. Sun. 1996. Gu, Z. j. & H. Sun. 1998.
<i>Ayenia</i>	<i>A. acalyphifolia</i> Griseb.	40	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>A. aemulata</i> Cristóbal	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002
	<i>A. glabra</i> S. Watson	22	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>A. schumanniana</i> Kuntze	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002. Fernández, A. 1981
<i>Byttneria</i>	<i>B. catalpifolia</i> subsp. <i>catalpifolia</i>	26	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>B. herbacea</i> Roxb	30	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002. Fernández, A. 1981
	<i>B. scalpellata</i> Pohl	28	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>B. subsessilis</i> Cristóbal	56	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>B. urticifolia</i> K. Schum.	78	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Commersonia</i>	<i>C. gaudichaudii</i> J. Gay	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Guazuma</i>	<i>G. tomentosa</i> Kunth	16	Pal, R. K. 1973. Jarolřmovă. 1994. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>G. ulmifolia</i> var. <i>ulmifolia</i>	16	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Guichenotia</i>	<i>G. angustifolia</i> (Turcz.) Druce	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>G. anota</i> C. F. Wilkins	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>G. ledifolia</i> J. Gay	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.

	<i>G. macrantha</i> Turcz.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Hannafordia</i>	<i>H. bissillii</i> subsp. <i>latifolia</i> (E. Pritz.) C. F. Wilkins	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>H. quadrivalvis</i> subsp. <i>quadrivalvis</i>	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Hermannia</i>	<i>H. candicans</i> Aiton	12	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Herrania</i>	<i>H. albiflora</i> Goudot	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>H. purpurea</i> (Pittier) R.E. Schult.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Keraudrenia</i>	<i>K. exastia</i> C. F. Wilkins	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002. Wilkins, C. F. 1999.
	<i>K. hermanniifolia</i> J. Gay	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>K. hillii</i> Benth.	60	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>K. velutina</i> subsp. <i>elliptica</i> C. F. Wilkins	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Kleinhovia</i>	<i>K. hospita</i> L.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
		40	Pal, R. K. 1973.
<i>Lasiopetalum</i>	<i>L. oldfieldii</i>	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Leptonychia</i>	<i>L. pubescens</i> Keay	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Lysiosepalum</i>	<i>L. involucreatum</i> (Turcz.) Druce	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2001.
	<i>L. rugosum</i> Benth	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.

<i>Melochia</i>	<i>M. argentina</i> R.E. Fr.	54	Riera, E. J. 1986.
	<i>M. borbonica</i> Cav.	18	Chatterjee, U. 1969. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>M. bracteosa</i> F. Hoffm.	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>M. corchorifolia</i> L.	36	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
		46	Sidhu, M. & S. S. Bir. 1983. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Rulingia</i>	<i>R. luteiflora</i> E. Pritz.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Seringia</i>	<i>S. arborescens</i> (W.T. Aiton) Druce	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Theobroma</i>	<i>T. bicolor</i> Bonpl.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. cacao</i> L.	16	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum	40	Guerra, M. d. S. 1986. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. leiocarpum</i> Bernoulli	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Thomasia</i>	<i>T. angustifolia</i> Steud	40	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. macrocarpa</i> Endl.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. pygmaea</i> (Turcz.) Benth.	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>T. solanaceae</i> (Sims) J. Gay	20	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Waltheria</i>	<i>W. acuminata</i> Rose	10	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002 Bates, D. M. 1976

		<i>W. americana</i> L.	26	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
			40	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002
		<i>W. indica</i> L.	24	Bir, B. & R. Srikanth. 1983.
			14-24	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
		<i>W. ovata</i> Cav.	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
Dombeyoideae	<i>Corchoropsis</i>	<i>C. tomentosa</i> (Thunb.) Makino	20	Ge, C. J., et al. 1992.
	<i>Dombeya</i>	<i>D. acutangula</i> Cav.	54	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. buettneri</i> K. Schum.	54	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. burgessiae</i> Gerrard ex Harv.	54	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. kirkii</i> Mast.	56	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. ledermannii</i> Engl.	56	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. rotundifolia</i> (Hochst.) Planch.	56	Seyani, J. H. 1991.
		<i>D. spectabilis</i> Cordem.	60	Gill, B. S., S. S. Bir & V. K. Singhal. 1979
		<i>D. torrida</i> subsp. <i>erythroleuca</i> (K. Schum.) Seyani	60	Seyani, J. H. 1991.
	<i>Eriolaena</i>	<i>E. hookeriana</i> Wight & Arn.	60	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1984.
	<i>Melhania</i>	<i>M. hamiltoniana</i> Wall.	60	Tang, Y. 1992.
	<i>Pentapetes</i>	<i>P. phoenicea</i> L.	76	Huang, S. f., Y. q. Wang, Z. y. Chen & X. h. Shi. 1988.
	<i>Pterospermum</i>	<i>P. acerifolium</i> Willd.	38	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Pal, R. K. 1973.
		<i>P. heterophyllum</i> Hance	38	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989.
		<i>P. heyneanum</i> Wall.	38	Pal, R. K. 1973.

		<i>P. lanceifolium</i> Roxb.	38	Pal, R. K. 1973.
		<i>P. suberifolium</i> (L.) Willd.	38	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987 Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1980a.
	<i>Trochetiopsis</i>	<i>T. benjamini</i> Cronk	40	Cronk, Q. C. B. 1995. Cronk, Q. C. B. 2000.
		<i>T. ebenus</i> Cronk	40	Cronk, Q. C. B. 1995. Cronk, Q. C. B. 2000.
		<i>T. erythroxyton</i> (G. Forst.) Marais	40	Cronk, Q. C. B. 2000.
Grewioideae	<i>Apeiba</i>	<i>A. tibourbou</i> Aubl.	36	Carvalheira, G. M. G., M. Guerra, G. A. d. Santos, V. C. d. Andrade & M. C. A. d. Farias. 1991. Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
	<i>Corchorus</i>	<i>C. aestuans</i> L.	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
		<i>C. baldaccii</i> Mattei	14	Jacob, T. V. 1983
		<i>C. capsularis</i> L.	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
			28	Srivastava, S. K., B. P. Pandey & R. S. Lal. 1979
		<i>C. depressus</i> (L.) Stocks	14	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
		<i>C. fascicularis</i> Lam	14	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002. Sanjappa, M. 1979a.
		<i>C. gillettii</i> Bari	14	Jacob, T. V. 1983
		<i>C. hirtus</i> L.	14	Coleman, J. R. 1982.
		<i>C. junodii</i> (Schinz) N.E.Br.	28	Paiva, J. & M. T. Leita. 1989.
		<i>C. olitorius</i> L.	14	Alam, S. S. & A. N. M. R. Rahman. 2000.
		<i>C. pseudocapsularis</i> Schweinf.	14	Jacob, T. V. 1983
		<i>C. siliquosus</i> L.	28	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
		<i>C. tridens</i> L.	14	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.

	<i>C. trilocularis L.</i>	14	Alam, S. S. & A. N. M. R. Rahman. 2000. Sanjappa, M. 1979.
<i>Entelea</i>	<i>E. arborescens R. Br.</i>	32	Wilkins, C. F. & J. A. Chappill. 2002.
<i>Glyphaea</i>	<i>G. brevis (Spreng.) Monach.</i>	16	Gill, L. S. & A. O. Obembe. 1991
<i>Grewia</i>	<i>G. arbutifolia Ventenat ex Jussieu</i>	18	Sarkar, A. K., N. DATTA & U. Chatterjee. 1973. Chatterjee, U. 1969.
	<i>G. asiatica L.</i>	36	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982.
	<i>G. aspera Roxb.</i>	36	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982.
	<i>G. disperma Rottler ex Spreng.</i>	18	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982.
	<i>G. elastica Royle</i>	18	Gill, B. S., V. K. Singhal, Y. S. Bedi & S. S. Bir. 1990. Gill, B. S., S. S. Bir & V. K. Singhal. 1979.
	<i>G. hainesiana Hole</i>	27	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982. Gill, B. S., V. K. Singhal, Y. S. Bedi & S. S. Bir. 1990. Gill, B. S., S. S. Bir & V. K. Singhal. 1979.
		36	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982. Gill, B. S., V. K. Singhal, Y. S. Bedi & S. S. Bir. 1990.
	<i>G. hirsuta Vahl</i>	18	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1984.
	<i>G. laevigata Vahl</i>	18	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982. Bir, S. S., B. S. Gill, Y. S. Bedi & V. K. Singhal. 1980.
	<i>G. leptopetala Brandis</i>	18	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982. Gill, B. S., V. K. Singhal, Y. S. Bedi & S. S. Bir. 1990. Gill, B. S., S. S. Bir & V. K. Singhal. 1979.
	<i>G. oppositifolia Buch.-Ham. ex Roxb.</i>	18	Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1982. Bir, S. S., B. S. Gill, Y. S. Bedi & V. K. Singhal. 1980.
	<i>G. optiva Drumm. ex Burret</i>	18	Khaton, S. & S. I. Ali. 1993.
	<i>G. tiliifolia Vahl</i>	18	Gill, B. S., V. K. Singhal, Y. S. Bedi & S. S. Bir. 1990.

		<i>G. vestita</i> Wall.	18	Sandhu, P. S. & S. K. Mann. 1988.
		<i>G. villosa</i> Willd.	36	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
		<i>G. welwitschii</i>	18	Morawetz, W. 1981b.
<i>Luehea</i>		<i>L. candicans</i> Mart.	36	Molero, J., A. Rovira, J. Simón, R. Duré & D. Franco. 2002.
		<i>L. ochrophylla</i> Mart.	36	Goldblatt, P. 1984.
<i>Sparrmannia</i>		<i>S. ricinocarpa</i> (Eckl. & Zeyh.) Kuntze	16	Jacob, T. V. 1983.
<i>Triumfetta</i>		<i>T. annua</i> L.	20	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989.
			32	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
		<i>T. longicornuta</i> Hutch. & M.B. Moss	32	Jacob, T. V. 1983.
		<i>T. macrophylla</i> K. Schum.	48	Jacob, T. V. 1983.
		<i>T. pentandra</i> A. Rich.	16	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982
			32	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
			32	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.
		<i>T. pilosa</i> Roth	64	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
		<i>T. rhomboidea</i> Jacq.	32	Paiva, J. & M. T. LEITAO. 1987.
			48	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
		<i>T. rotundifolia</i> Lam.	32	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982. Sanjappa, M. 1979.
Helicteroideae	<i>Cullenia</i>	<i>C. excelsa</i> Wight	56	Pushparajan, G., P. I. Kuriachan & C. A. Ninan. 1986.
	<i>Durio</i>	<i>D. zibethinus</i>	28	Datta, P. C.; Biswas, C., 1968
			58	Mangenot; Mangenot, 1958, 1962

	<i>Helicteres</i>	<i>H. brevispira</i> A. St.-Hil.	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. guazumifolia</i> Kunth	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. hirsuta</i> Lour.	24	Pal, R. K. 1973.
		<i>H. isora</i> L.	18	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987
		<i>H. jamaicensis</i> Jacq.	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. lhotzkyana</i> (Schott & Endl.) K. Schum.	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. ovata</i> Lam.	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. sacarolha</i> A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.	18	Fernández, A. 1981.
		<i>H. vegae</i> Cristóbal	18	Cristóbal, C. L. 1987.
		<i>H. velutina</i> K. Schum.	18	Fernández, A. 1981.
Malvoideae	<i>Abelmoschus</i>	<i>A. angulosus</i> Wight & Arn.	66	Krishnappa, D. G. & Munirajappa, 1982.
			66	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989
			130	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981
		<i>A. esculentus</i> (L.) Moench	65	Madhusoodaneni, K. J. & M. A. Nazeer. 1986. Nair, P. G. & P. Kuriachan. 1976. Mamidwar, R. B., Y. S. Nerkar & N. D. Jambhale. 1979.
			120	Ge, C. j., Y. k. Li, P. Wan & P. s. Hsu. 1989.
		<i>A. ficulens</i> L.	72	Sanjappa, M. 1979.
		<i>A. manihot</i> (L.) Medik.	130	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981.
			196	Madhusoodaneni, K. J. & M. A. Nazeer. 1986.
			40	Chen, R. Y. 2003
		<i>A. moschatus</i> Medik.	72	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
	<i>A. tuberculatus</i> Pal & Singh	58	Nair, P. G. & P. Kuriachan. 1976.	
	<i>Abutilon</i>	<i>A. alii</i> Abedin	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.

<i>A. avicennae</i> Gaertn.	42	Lessani, H. & S. Chariat-panahi. 1979
<i>A. barrancae</i> M.E. Jones	16	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>A. bidentatum</i> Hochst. ex <i>A. Rich.</i>	42	Bir, S. S. & M. Sidhu. 1979.
<i>A. crispum</i> (L.) G. Don	14	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1993. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>A. figarianum</i> Webb	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
<i>A. fluviatile</i> (Vell.) K. Schum.	16	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003
<i>A. fruticosum</i> var. <i>fruticosum</i>	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988
<i>A. glaucum</i> (Cav.) Cav.	42	Sanjappa, M. 1979.
<i>A. grandifolium</i> (Willd.) Sweet	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988. Hussain, S. A., V. A. Saeed & S. S. Husain. 1989.
<i>A. hirtum</i> var. <i>hirtum</i>	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
<i>A. hulseanum</i> (Torr. & A. Gray) Torr. ex A. Gray	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>A. inaequilaterum</i> A. St.-Hil.	16	Fernández, A. 1981.
<i>A. indicum</i> (L.) Sweet	36	Podlech, D. 1986
	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988. Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1993. Bir, S. S. & M. Sidhu. 1980. Bir, S. S. & M. Sidhu. 1980.
	72	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982. Bir, S. S. & M. Sidhu. 1979.
<i>A. julianae</i> Endl.	56	Lange, P. J. & B. G. Murray. 2003.
<i>A. karachianum</i> S.A. Husain & Baquar	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
<i>A. laxum</i> Rusby	16	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>A. macvaughii</i> Fryxell	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>A. malacum</i> S. Watson	14	Reveal, J. L. & R. Spellenberg. 1976.
<i>A. menziesii</i> Seem.	28	Carr, G. D. 1985

	<i>A. mucronatum</i> J.E. Fryxell	14	Fryxell, J. E. 1983.
	<i>A. muelleri-friderici</i> Gürke & K. Schum.	16	Fernández, A. 1981.
	<i>A. muticum</i> (Delile) Sweet	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
	<i>A. neelgerrense</i> Munro	42	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1983. Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1993. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>A. otocarpum</i> F. Muell.	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A. pakistanicum</i> Jafri & Ali	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
	<i>A. pannosum</i> (G. Forst.) Schltld.	42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988. Hussain, S. A., V. A. Saeed & S. S. Husain. 1989
	<i>A. parishii</i> S. Watson	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A. persicum</i> (Burm. f.) Merr.	42	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1983. Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1993. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980
	<i>A. pictum</i> (Gillies ex Hook. & Arn.) Walp.	16	Fernández, A. 1981.
	<i>A. polyandrum</i> (Roxb.) Wight & Arn.	16	Sanjappa, M. 1979.
	<i>A. regnellii</i> Miq.	16	Fernández, A. 1981
	<i>A. sepalum</i> S.A. Husain & Baquar	36-42	Afaq-Husain, S., V. A. Saeed & S. Shahid-Husain. 1988.
	<i>A. sonoriae</i> A. Gray	14	Ward, D. E. 1984.
	<i>A. sphaerostaminum</i> Hochr.	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A. striatum</i> Dicks. ex Lindl.	16	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1983. Fernández, A. 1981. Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1993
	<i>A. theophrasti</i> Medik.	42	Shatokhina. 2006.
	<i>A. virgatum</i> (Cav.) Sweet	16	Fernández Casas, F. J. 1982.
<i>Acaulimalva</i>	<i>A. parnassiifolia</i> (Hook.) Krapov.	20	Sundberg, S. D. & M. O. Dillon. 1986

<i>Alcea</i>	<i>A. biennis</i> Winterl.	42	Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993. Dobe, C. & B. Hahn. 1997. Vachova, M. & J. Majovsky. 1980
	<i>A. heldreichii</i> (Boiss.) Boiss.	42	Markova, M. L. 1989. Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993.
	<i>A. kurdica</i> (Schltr.) Alef.	42	Chariat-Panahi, M. S., H. Lessani & D. Cartier. 1982
	<i>A. longipedicellata</i> Riedl	42	Ghaffari, S. M. & S. Chariat-Panahi. 1985.
	<i>A. pallida</i> (Waldst. & Kit. ex Willd.) Waldst. & Kit.	42	Markova, M. 1982.
	<i>A. rosea</i> L.	42	Murín, A. 1993.
		42-84	Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993.
	<i>A. rugosa</i> Alef.	42	Guinochet, M. & M. Lefranc. 1981.
<i>Allowissadula</i>	<i>A. floribunda</i> (Schltdl.) Fryxell	16	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
		40	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.
<i>Althaea</i>	<i>A. cannabina</i> L.	84	Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993.
	<i>A. hirsuta</i> L.	50	Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993.
	<i>A. kurdica</i> Schltdl.	42	Lessani, H. & S. Chariat-panahi. 1979.
	<i>A. officinalis</i> L	40	Amadei, L., A. Giordani & P. E. Tomei. 1983.
		42	Probatova, N. S., E. G. Rudyka & A. P. Sokolovskaya. 1996.
	<i>A. rosea</i> (L.) Cav.	42	Chen, R. Y., 2003.
		40	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.

<i>Anoda</i>	<i>A.abutiloides</i> A. Gray	30	Bates, D. M. 1987. Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A.albiflora</i> Fryxell	30	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A. crenatiflora</i> Ortega	60	Bates, D. M. 1987
	<i>A.cristata</i> (L.) Schltld.	60	Probatova, N. S. & A. P. Sokolovskaya. 1988. Bates, D. M. 1987.
	<i>A. leonensis</i> Fryxell	30	Bates, D. M. 1987.
	<i>A. palmata</i> Fryxell	30	Bates, D. M. 1987. Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>A.pedunculosa</i> Hochr.	30	Bates, D. M. 1987.
	<i>A. pentaschista</i> A. Gray	30	Bates, D. M. 1987.
	<i>A. pubescens</i> Schltld.	30	Bates, D. M. 1987.
	<i>A. thurberi</i> A. Gray	26-28	Bates, D. M. 1987.
	<i>A. zuccagnii</i> (Spreng.) Fryxell	30	Bates, D. M. 1987.
<i>Azanza</i>	<i>A. lampas</i> (Cav.) Alef.	28	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982.
<i>Bastardia</i>	<i>B. bivalvis</i> (Cav.) Kunth	28	Krapovickas, A. 1969.
<i>Batesimalva</i>	<i>B. killipii</i> Krapov. ex Fryxell	24	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>B.pulchella</i> Fryxell	32	Fryxell, P. A. 1975.
	<i>B. violacea</i> (Rose) Fryxell	32	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>Callirhoe</i>	<i>C. alcaeoides</i> (Michx.) A. Gray	28	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1989
	<i>C. bushii</i> Fernald	28	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1990
	<i>C. digitata</i> Nutt.	28	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1991
	<i>C. involucrata</i> var.	60	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J.

	<i>involucrata</i>		Blanchard. 1992
	<i>C. leiocarpa</i> R.F. Martin	28	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1993
	<i>C. papaver</i> (Cav.) A. Gray	112	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1994
	<i>C. pedata</i> (Nutt. ex Hook.) A. Gray	28	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1995
	<i>C. triangulata</i> (Leavenw.) A. Gray	30	Bates, D. M., L. J. Dorr & O. J. Blanchard. 1996
<i>Cienfuegosia</i>	<i>C. concilata</i> Krapov.	20	Fernández, et al. (2003)
	<i>C. intermedia</i> Fryxell	20	Fryxell; Stelly (1993)
	<i>C. ulmifolia</i> Fryxell	20	Fryxell; Stelly (1993)
<i>Cristaria</i>	<i>C. dissecta</i> Hook. & Arn.	12	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003
<i>Decaschistia</i>	<i>D. crotonifolia</i> Wight & Arn.	30	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>D. trilobata</i> Wight	30	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>Dirhamphis</i>	<i>D. balansae</i> Krapov.	14	Fernández, A. 1981.
	<i>D. mexicana</i> Fryxell	30	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>Fryxellia</i>	<i>F. pygmaea</i> (Correll) D.M. Bates	16	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993. Fryxell, P. A. & J. V. R. 1991.
<i>Gaya</i>	<i>G. bordasii</i> Krapov.	12	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>G. domingensis</i> Urb.	12	Krapovickas, A. 1996.
	<i>G. gaudichaudiana</i> A. St.-Hil.	24	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>G. guerkeana</i> K. Schum.	12	Coleman, J. R. 1982.
<i>Gossypium</i>	<i>G. amourianum</i> Kearney	26	Chen, R. Y. et al. (2003)
	<i>G. anomalum</i> Wawra	26	Chen, R. Y. 2003. Mehetre, S. S., V. R. Patil, A. R. Aher & V. L.

& Peyr.		Gawande. 2003.
<i>G. arboreum</i> L.	26	Dhamayanthi, K. P. M. 2005.
<i>G. areysianum</i> Defflers	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003
<i>G. aridum</i> (Rose & Standl.) Skovst.	26	Dhamayanthi, K. P. M. 2005.
<i>G. armourianum</i> Kearney	26	Pushpam. 2006.
<i>G. australe</i> F. Muell.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003
<i>G. barbadense</i> L.	52	Chen, R. Y. et al. (2003)
	26	Kadir, Z. B. A. 1976
<i>G. barbosanum</i> L.L. Phillips & Clem.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003
<i>G. bengalense</i>	26	Gennur, M. N., S. N. Kadapa, A. F. Habib & J. V. Goud. 1988.
<i>G. bickii</i> Prokh.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003. Song, P. 1990.
<i>G. capitis-viridis</i> Mauer	26	Chen, R. Y. et al. 2003
<i>G. costulatum</i> Tod.	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. darwinii</i> G. Watt	26	Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. davidsonii</i> Kellogg	26	Dhamayanthi, K. P. M. 2005.
<i>G. exiguum</i> Fryxell, Craven & J. McD. Stewart	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. farbadense</i> L.	52	Nei, R. & M. Li. 1985.
<i>G. gossypoides</i> (Ulbr.) Standl.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003. Wang, K. b. & M. x. Li. 1990.
<i>G. harknessii</i> Brandeggee	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Wang, K. b., M. x. Li, X. d. Zhang & G. I. Song. 1996
<i>G. herbaceum</i> L.	26	Dhamayanthi, K. P. M. 2005.
<i>G. hirsutum</i> L.	52	Dhamayanthi, K. P. M. 2005.
	39	Mehetre, S. S. & M. V. Thombre. 1982.
	26	Pushpam. 2006.

<i>G. incanum</i>	26	Kadir, Z. B. A. 1976.
<i>G. indicum</i> Lam.	26	Gennur, M. N., S. N. Kadapa, A. F. Habib & J. V. Goud. 1988.
<i>G. klotzschianum</i> Andersson	26	Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. laxum</i> L.L. Phillips	26	Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. lobatum</i> Gentry	26	Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Wang, K. b., M. x. Li, X. d. Zhang & G. I. Song. 1996.
<i>G. longicalyx</i> Hutch. & B.J.S.Lee	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. mustelinum</i> Miers ex Watt	52	Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. nelsonii</i> Fryxell	26	Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. nobile</i> Fryxell, Craven & J. McD. Stewart	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. persicum</i>	26	Gennur, M. N., S. N. Kadapa, A. F. Habib & J. V. Goud. 1988.
<i>G. pilosum</i> Fryxell	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. populifolium</i> (Benth.) F. Muell. ex Tod.	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. pulchellum</i> (C. A. Gardner) Fryxell	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. raimondii</i> Ulbr.	26	Kadir, Z. B. A. 1976.
<i>G. robinsonii</i> F. Muell.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. rotundifolium</i> Fryxell, Craven & J. McD. Stewart	26	Fryxell, P. A., L. A. Craven & J. M. Stewart. 1992.
<i>G. somalense</i> (Gürke) J.B. Hutch., Silow & S.G. Stephens	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. stocksii</i> Mast.	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003. Wang, K. b., M. x. Li, X. d. Zhang & G. I. Song. 1996.
<i>G. sturtianum</i> J. H. Willis	26	Kadir, Z. B. A. 1976. Chen, R. Y. et al. 2003.
<i>G. thurberi</i> Tod.	26	Kadir, Z. B. A. 1976.
<i>G. tomentosum</i>	52	Kadir, Z. B. A. 1976. Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Nei, R. & M. Li. 1985.

	<i>G. trilobum</i> (DC.) <i>Skovst.</i>	26	Wang, K. b. & M. x. Li. 1990. Chen, R. Y. et al. 2003.
	<i>G. triphyllum</i> (Harv.) <i>Hochr.</i>	26	Kadir, Z. B. A. 1976.
	<i>G. wightianum</i> Tod.	26	Gennur, M. N., S. N. Kadapa, A. F. Habib & J. V. Goud. 1988.
<i>Hampea</i>	<i>H. rovirosae</i> Standl.	26	Goldblatt, P. 1984.
<i>Herissantia</i>	<i>H. nemoralis</i> (St. Hil.) <i>Brizicky</i>	14	Fernández, A. 1981.
<i>Hibiscus</i>	<i>H. aculeatus</i> subsp. <i>dostalii</i> (Domin) <i>Dostál</i>	36	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. adscensionis</i> <i>Fryxell & Krapov.</i>	72	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>H. altissimus</i> Hornby	72	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. archeri</i>	84	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1984.
	<i>H. asper</i> Hook. f.	36	Akpan, G. A. & M. G. Hossain. 1998.
	<i>H. bifurcatus</i> Cav.	36	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. brackenridgei</i> subsp. <i>brackenridgei</i>	72	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. caesius</i> Garcke	18	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981.
	<i>H. calyphyllus</i> Cav.	80	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>H. cannabinus</i> L.	36	Hiron. 2006.
	<i>H. citrinus</i> Fryxell	22	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>H. coccineus</i> Walter	38	Yang, D. k. 1998.
	<i>H. costatus</i> A. Rich	18	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. cucurbitaceus</i> A. <i>St.-Hil.</i>	36	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. cultivars</i>	63-	Nakamura, T., N. Nomoto & Y.

	84	Jotani. 1984.
<i>H. denisonii</i>	84	Nakamura, T. & N. Nomoto. 1985.
	168	Nakamura, T. & N. Nomoto. 1985.
<i>H. diversifolius subsp. diversifolius</i>	144	Menzel, M. Y. & J. F. Hancock. 1984.
<i>H. elatus Sw.</i>	60-90	Butorina, A. K., L. S. Muraya & W. Moreno. 1990.
<i>H. flagelliformis Saint-Hilaire</i>	144	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983
<i>Hibiscus furcatus Willd.</i>	154	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982.
<i>H. furcatus Wall.</i>	54	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989.
<i>H. furcellatus Desv.</i>	72	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
<i>H. grandidieri Baill.</i>	32	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>H. hiernianus Exell & Mendonca</i>	36	Menzel, M., K. Richmond, C. Contolini & P. Huang. 1986.
<i>H. hirtus L.</i>	64	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989.
<i>H. hongjinma Y.T. Chang</i>	36	Chang, Y. t. 1991.
<i>H. kitaibelifolius A. St.-Hil.</i>	36	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983
<i>H. kokio Hillebr. Ex Wawra</i>	84	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1984. Nakamura, T. & N. Nomoto. 1987.
<i>H. laxiflorus A. St.-Hil.</i>	72	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983
<i>H. lobatus (Murray) Kuntze</i>	34	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989.
	72	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982.
<i>H. lunariifolius Willd.</i>	40	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>H. maculatus Lam.</i>	180	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
<i>H. makinoi Jotani & Ohba</i>	93	Jotani, Y. & H. Ohba. 1984.
<i>H. mastersianus Hiern</i>	36	Menzel, M., K. Richmond, C. Contolini & P. Huang. 1986.

<i>H.mechowii</i> Garcke	36	Menzel, M., K. Richmond, C. Contolini & P. Huang. 1986.
<i>H.mutabilis</i> L.	92	Zhuang, D. h. & J.-j. Song. 2005.
	120	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981.
<i>H. newhousei</i>	84	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1984.
<i>H. obtusilobus</i> Garcke	28	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
<i>H.ovalifolius</i> (Forssk.) Vahl	32	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980. Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989.
	64	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982.
<i>H.pacificus</i> Nakai ex Y. Jotani & H. Ohba	92	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1986.
<i>H.panduraeformis</i> Burman	24	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989.
<i>H.pentaphyllus</i> F. Muell.	36	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>H. peruvianus</i> R.E. Fr.	36	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
<i>H. platanifolius</i> (Willd.) Sweet	40	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980
<i>H. pohlii</i> Gürke	72	Lavia. 2004.
<i>H.radiatus</i> Cav.	72	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980
<i>H. rosa-sinensis</i> L.	36- 147	Shanmughasundaram, K. 1992. Zhuang, D. h. & J.-j. Song. 2005.
<i>H. sabdariffa</i> L.	18	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989.
	36	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989.
	72	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982. Hiron. 2006.
<i>H. saintjohnianus</i>	65	Nakamura, T. & N. Nomoto. 1985
	84	Nakamura, T. & N. Nomoto. 1985
<i>H. schizopetalus</i> (Dyer) Hook. f.	34	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.

		42	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1984. Zhuang, D. h. & J.-j. Song. 2005.
	<i>H. surattensis</i> L.	36	Akpan, G. A. & M. G. Hossain. 1998.
	<i>H. syriacus</i> L.	80	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.
		88	Chen, R. y., W. q. Song, X. l. Li, M. x. Li, G. l. Liang & C. b. Chen. 2003.
	<i>H. taiwanensis</i> S.Y. Hu	92	Nakamura, T., N. Nomoto & Y. Jotani. 1986. Cheng, Y. f. & J. l. Tsai. 1999.
	<i>H. tiliaceus</i> L.	86	Satyanarayan, J., P. Sahoo & A. B. Das. 2003
		96	Munirajappa & D. G. Krishnappa. 1989. Cheng, Y. f. & J. l. Tsai. 1999. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>H. trionum</i> L.	28	Lange, P. J. & B. G. Murray. 2002.
		56	Shatokhina. 2006
	<i>H. uncinellus</i> DC.	72	Menzel, M. Y., P. A. Fryxell & F. D. Wilson. 1983.
	<i>H. vitifolius</i> L.	34	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.
	<i>H.welbyi</i> Sprague	36	Spellenberg, R. & D. Ward. 1988.
	<i>H. wilsonii</i> Fryxell	72	Lavia. 2004.
<i>Hoheria</i>	<i>H. aff.populnea</i> A. Cunn.	42	Murray, B. G. & P. J. d. Lange. 1999.
	<i>H.sexstylosa</i> Colenso aff.	42	Murray, B. G. & P. J. d. Lange. 1999.
<i>Horsfordia</i>	<i>H.exalata</i> Fryxell	30	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>Kydia</i>	<i>K. calycina</i> Roxb.	98	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>Lavatera</i>	<i>L. agrigentina</i> Tineo	44	
		88	Serra, C., B. Valdés, R. Marcucci & N. Tornadore. 2001.
	<i>L. arborea</i> L.	40	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.

	<i>L. bryoniifolia</i> Mill.	42	Snogerup, S. 1995.
	<i>L. cachemiriana</i> var. <i>haroonii</i> Abedin	42	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
	<i>L. cretica</i> L.	112	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
	<i>L. maritima</i> Gouan	44	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
	<i>L. oblongifolia</i> Boiss.	42	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
	<i>L. olbia</i> L.	42	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
	<i>L. thuringiaca</i> L.	44	Dmitrieva, S. A. 1986. Sekovski, Z. & M. Jovanovska. 1983. Van Loon, J. C. & B. Kieft. 1980.
		46	Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993. Jav Ourková-Jarolímová, V. 1992.
	<i>L. triloba</i> L.	42	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
	<i>L. trimestris</i> L.	14	Luque, T. & J. A. Devesa. 1986.
<i>Malachra</i>	<i>M. capitata</i> (L.) L.	56	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981
	<i>M. lobata</i> L.	28	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982.
	<i>M. radiata</i> (L.) L.	56	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Malope</i>	<i>M. trifida</i> Cav.	44	Izmai low, R. 1989. Pogan, E., A. Jankun & Z. Sawicka. 1990.
<i>Malva</i>	<i>M. alcea</i> L.	84	Lövkvist, B. & U. M. Hultgård. 1999.
	<i>M. crispa</i> (L.) L.	84	Zhang, T. j. 1992.
	<i>M. mauritiana</i> L.	42	Probatova, N. S. & A. P. Sokolovskaya. 1986. Murín, A. 1997. Probatova, N. S., E. G. Rudyka & A. P. Sokolovskaya. 1996.
	<i>M. mohileviensis</i> <i>Downar</i>	84	Probatova, N. S. & A. P. Sokolovskaya. 1986.
	<i>M. moschata</i> L.	42	Lövkvist, B. & U. M. Hultgård. 1999.
	<i>M. nicaeensis</i> All.	42	Slavík, B., V. Jarolímová & J. Chrték. 1993. Markova, M. L. & V. Y. Goranova. 1993.
	<i>M. nicaeensis</i> All.	42	Probatova. 2006.

	<i>M. pusilla</i> Sm.	42	Lökvist, B. & U. M. Hultgård. 1999.
	<i>M. sinensis</i> Cav.	36	Xu, B. s., R. f. Weng & M. z. Zhang. 1992
		42	Zhang, T. j. 1992. Chen, R. Y. 2003.
	<i>M. sylvestris</i> L.	42	Al-Bermani, A. K. K. A., K. I. A. Al-Shammary, R. J. Gornall & J. P. Bailey. 1993.
	<i>M. tournefortiana</i> L.	42	González Zapatero, M. A. & J. A. E. Rosselló. 1986. Diosdado, J. C., C. Santa-Bárbara, J. Vioque, R. Juan & J. Pastor. 1993. Serra, C., B. Valdés, R. Marcucci & N. Tornadore. 2001.
	<i>M. verticillata</i> L.	126	GERVAIS, C. 1979a.
<i>Malvastrum</i>	<i>M. amblyphyllum</i> R.E. Fr.	24	Hill, S. R. 1982.
	<i>M. americanum</i> subsp. <i>americanum</i>	24	Hill, S. R. 1982.
	<i>M. aurantiacum</i> (Scheele) Walp.	36	Hill, S. R. 1982.
	<i>M. bicuspidatum</i> (S. Watson) Rose	24	Krapovickas, A. 1969.
	<i>M. corchorifolium</i> (Desr.) Britton ex Small	48	Fernández, A. 1981. Hill, S. R. 1982.
	<i>M. coromandelianum</i> (L.) Garcke	24	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
	<i>M. grandiflorum</i> Krapov.	24	Fernández, A. 1981.
	<i>M. interruptum</i> K. Schum.	36	Hill, S. R. 1982.
	<i>M. scoparioides</i> Ulbr.	48	Hill, S. R. 1982.
	<i>M. scoparium</i> (L'Hér.) A. Gray	24	Krapovickas, A. 1969.
	<i>M. tomentosum</i> subsp. <i>tomentosum</i>	24	Hill, S. R. 1982.
<i>Malvaviscus</i>	<i>M. arboreus</i> Cav.	28	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.

<i>Modiola</i>	<i>M. caroliniana</i> (L.) G. Don	18	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>Monteiroa</i>	<i>M. reitzii</i> Krapov.	20	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Palaua</i>	<i>P. rhombifolia</i> R. Graham	10	Krapovickas, A. 1969.
<i>Pavonia</i>	<i>P. coxii</i> Tadul. & Jacob.	28	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982
	<i>P. ecostata</i> Fryxell & S.D. Koch	56	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>P. friesii</i> Krapov.	56	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003
	<i>P. fruticosa</i> (Mill.) Fawc. & Rendle	56	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003
	<i>P. garckeana</i> Gürke	56	Fernández, A. 1981.
	<i>P. lanata</i> R.E. Fr.	56	Fernández, A. 1981
	<i>P. laxifolia</i> A. St.-Hil.	56	Fernández, A. 1981
	<i>P. odorata</i> Willd.	26	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>P. patens</i> (Andrews) Chiov.	28	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981.
	<i>P. procumbens</i> (Wight. & Arn.) Walp.	28	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1982.
	<i>P. sagittata</i> A. St.-Hil.	56	Fernández, A. 1981.
	<i>P. schrankii</i> Spreng.	56	Fernández, A. 1981.
	<i>P. subrotunda</i> A. St.- Hil. & Naudin	56	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>P. urens</i> Cav.	56	Morton, J. K. 1993.
	<i>P. zeylanica</i> Cav.	52	Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1982. Dasgupta, A. & R. P. Bhatt. 1981.
<i>Periptera</i>		56	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>P. punicea</i> (Lag.) DC.	26	Bates, D. M. 1987.

<i>Phragmocarpidium</i>	<i>P. heringeri</i> Krapov.	50	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Phymosia</i>	<i>P. umbellata</i> (Cav.) Kearney	34	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>Plagianthus</i>	<i>P. chathamicus</i> Cockayne	42	de Lange, P. J., B. G. Murray & P. M. Datson. 2004.
<i>Pseudabutilon</i>	<i>P. cinereum</i> (Griseb.) Krapov.	16	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Senra</i>	<i>S. incana</i> Cav.	34	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
<i>Sida</i>	<i>S. abutilifolia</i> Mill.	14	Ward, D. E. 1984.
	<i>S. acuta</i> (Burm.) Bors. Waalk.	28	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990.
	<i>S. aggregata</i> C. Presl	16	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>S. alba</i> L.	14	Sidhu, M. & S. S. Bir. 1983. Bir, S. S. & M. Sidhu. 1980.
	<i>S. angustissima</i> Saint-Hilaire	14	Krapovickas, A. 1969.
	<i>S. argentina</i> var. <i>tucumanensis</i> Hassl. ex Rodrigo	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>S. cerradoensis</i> Krap.	14	Fernández, A. 1981.
	<i>S. cordata</i> (Burm. f.) Borss. Waalk.	32	Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980. Noor, S. S., S. S. Deen, L. Ahmed, R. Begum, M. A. Zaman & S. S. Alam. 2003.
	<i>S. cordifolia</i> L.	28	Ugborogho, R. E. 1982a. Sidhu, M. K., R. C. Gupta & N. Goyal. 1990. Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
	<i>S. dictyocarpa</i> Griseb. ex K. Schum.	16	Krapovickas, A. 1969.
	<i>S. filicaulis</i> Torr. & A. Gray	12	Ward, D. E. 1983.
	<i>S. garckeana</i> Pol.	28	Scott Emuakpor, M. B. & R. E. Ugborogho. 1980.
	<i>S. glaziovii</i> K. Schum.	28	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.

<i>S. glomerata</i> Cav.	14	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. glutinosa</i> Comm. ex Cav.	16	Krapovickas, A. 1969.
	32	Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
<i>S. hassleri</i> Hochr.	14	Krapovickas, A. 1969.
<i>S. hatschbachii</i> Krapov.	42	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. hirsutissima</i> Mill.	28	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. jussieuana</i> DC.	16	Krapovickas, A. 1969.
<i>S. lindheimeri</i> Engelm. & A. Gray	28	Krapovickas, A. 1969. Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
<i>S. linifolia</i> Cav.	14	Coleman, J. R. 1982. Ugborogho, R. E. 1982a
<i>S. lonchitis</i> St. Hil. & Naud.	14	Fernández, A. 1981.
<i>S. martiana</i> A. St.- Hil.	14	Fernández, A. 1981.
<i>S. micrantha</i> A. St.- Hil.	32	Krapovickas, A. 1969.
<i>S. mysorensis</i> Wight & Arn.	32	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999
<i>S. orata</i> Forssk.	28	Ugborogho, R. E. 1982a
<i>S. pakistanica</i> Abedin	28	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1982.
<i>S. parvifolia</i> DC.	28	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999
<i>S. pilosa</i> Mill.	56	Ugborogho, R. E. 1982a
<i>S. planicaulis</i> Cav.	28	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. plumosa</i> Cav.	32	Fernández, A. 1981.
<i>S. reitzii</i> Krapov.	42	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. rhombifolia</i> L.	14	Molero, J., A. Rovira, J. Simón, R. Duré & D. Franco. 2002.
<i>S. rhomboidea</i> Roxb. ex Fleming	14	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
<i>S. rodrigo</i> Monteiro	28	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>S. rohlenae</i> var. <i>mutica</i> (Benth.) Fryxell	14	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.

	<i>S. rufescens</i> A. St.-Hil.	32	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003
	<i>S. salviaefolia</i> var. <i>submutica</i> Howell, J. T.	28	Fernández, A. 1981.
	<i>S. spinosa</i> L.	14	Probatova, N. S. & A. P. Sokolovskaya. 1986 Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
		28	Ugborogho, R. E. 1982a.
	<i>S. tiagii</i> Bhandari	28	Dawar, R., T. Ali & M. Qaiser. 1996 Zaidi, S. 2003.
	<i>S. tuberculata</i> R.E. Fr.	28	Fernández, A. 1981.
	<i>S. ulmifolia</i> Mill.	28	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>S. uniaristata</i>	14	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
	<i>S. urens</i> L.	32	Ugborogho, R. E. 1982a. Krapovickas, A. 1969.
	<i>S. veronicifolia</i> Lam.	32	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
	<i>S. vespertina</i> Ekman	14	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
	<i>S. yunnanensis</i> S. Y. Hu	14	Khatoon, S. & S. I. Ali. 1993.
<i>Sidalcea</i>	<i>S. candida</i> var. <i>candida</i>	20	Ward, D. E. & R. Spellenberg. 1988.
	<i>S. nelsoniana</i> Piper	20	Chambers, K. L., D. Green, S. Potampa & L. McMahan. 1998.
<i>Sphaeralcea</i>	<i>S. ambigua</i> A. Gray	30	Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993
	<i>S. angustifolia</i> (Cav.) G. Don	20	WEEDIN, J. F. & A. M. POWELL. 1980.
	<i>S. coccinea</i> (Nutt.) Rydb.	10	Love, A. & D. Love. 1982.
	<i>S. coulteri</i> (S. Watson) A. Gray	10	Keil, D. J. 1981.
	<i>S. digitata</i> var. <i>digitata</i>	10	Ward, D. E. & R. Spellenberg. 1988.
	<i>S. fendleri</i> A. Gray	10	WEEDIN, J. F. & A. M. POWELL. 1980.
	<i>S. grossulariifolia</i> var. <i>pedata</i> (Torr. ex A. Gray) Kearney	20	Ward, D. E. & R. Spellenberg. 1988.

	<i>S. incana</i> var. <i>incana</i>	20	LaDuke, J. C. 1986. Ward, D. E. & R. Spellenberg. 1988.
	<i>S. lava</i> W. & S.	20	Ward, D. E. 1984.
	<i>S. laxa</i> Wooton & Standl.	10	Ward, D. E. 1983.
	<i>S. leptophylla</i> (A. Gray) Rydb.	20	Ward, D. E. 1984.
	<i>S. polychroma</i> La Duke	20	LaDuke, J. C. 1985.
	<i>S. reflexa</i> Fryxell, J. Valdés & Villarreal	20	Fryxell, P. A., J. V. Reyna & J. A. V. Q. 1991 Fryxell, P. A. & D. M. Stelly. 1993.
	<i>S. subhastata</i> var. <i>martii</i> (Cockerell) Kearney	10	Ward, D. E. 1983.
	<i>S. subhastata</i> var. <i>pumila</i> (Wooton & Standl.) Kearney	30	Ward, D. E. & R. Spellenberg. 1988.
	<i>S. wrightii</i> A. Gray	20	LaDuke, J. C. 1986.
<i>Tarasa</i>	<i>T. nototrichoides</i> (Hochr.) Krapovickas	20	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Thespesia</i>	<i>T. lampas</i> (Cav.) Dalzell & A. Gibson	26	Wang, Y. n. & Z. j. Sun. 1987. Krishnappa, D. G. & K. S. GEETHA. 1977. Krishnappa, D. G. & Munirajappa. 1980.
	<i>T. populnea</i> (L.) Sol. ex Corrêa	26	Jena, S., P. Sahoo, S. Mohanty, A. B. Das & P. Das. 2002.
<i>Tropidococcus</i>	<i>T. pinnatipartitus</i> (A. St.-Hil. & Naudin) Krapov.	24	Fernández, A., A. Krapovickas, G. Lavia & G. Seijo. 2003.
<i>Urena</i>	<i>U. lobata</i> L.	28	Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
		56	Guerra, M. d. S. 1986.
	<i>U. procumbens</i> L.	28	Huang, S. f., Z. f. Zhao, Z. y. Chen, S. j. Chen & X. x. Huang. 1989. Cheng, Y. f. & J. I. Tsai. 1999.
<i>Wissadula</i>	<i>W. amplissima</i> (L.) R.E. Fr.	14	Coleman, J. R. 1982.
	<i>W. fadyenii</i> R.E. Fr.	14	Fernández, A., A. Krapovickas, G.

Sterculioideae	Brachychiton	Lavia & G. Seijo. 2003.		
		<i>B. acerifolius</i> (A. Cunn.) Macarthur & C. Moore	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. albidus</i> Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. australis</i> (Schott & Endlicher) A. Terracc.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. bidwillii</i> Hook.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. chillagoensis</i> Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. discolor</i> F. Muell.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. diversifolius</i> (G. Don) A. Terracc.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. grandiflorus</i> Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. incanus</i> R. Br.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. multicaulis</i> Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. populneus</i> subsp. <i>populneus</i>	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. rupestris</i> (Mitchell) K. Schum.	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. tuberculatus</i> (W. Fitzg.) Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. viridiflorus</i> (W. Fitzg.) Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. viscidulus</i> (W. Fitzg.) Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
		<i>B. vitifolius</i> (Bailey) Guymer	40	Guymer, G. P. 1988.
	Firmiana	<i>F. colorata</i> (Roxb.) R. Br.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1984.
		<i>F. pallens</i> (Wall. ex King) Kosterm.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1984. Bir, S. S., B. S. Gill, Y. S. Bedi & V. K. Singhal. 1980.
		<i>F. simplex</i> (L.) W. Wight	40	Huang, S. f., Y. q. Wang, Z. y. Chen & X. h. Shi. 1988. Zhao, Z. f., Y. q. Wang & S. f. Huang. 1990.

	<i>Fremontodendron</i>	<i>F.sp.</i>	40	Bayer, C. et al. 1999
	<i>Heritiera</i>	<i>H. fomes</i> Buch.-Ham.	28	Pal, R. K. 1973. Das, A. B., U. C. Basak & P. Das. 1995. Das, A. B., A. K. Mukherjee & P. Das. 2001.
		<i>H. littoralis</i> Aiton	28-38	Das, A. B., U. C. Basak & P. Das. 1995. Das, A. B., A. K. Mukherjee & P. Das. 2001.
		<i>H. macrophylla</i> Wall.	38	Das, A. B., U. C. Basak & P. Das. 1995. Das, A. B., A. K. Mukherjee & P. Das. 2001.
	<i>Pterygota</i>	<i>P. alata</i> (Roxb.) R. Br.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987.
	<i>Sterculia</i>	<i>S. acerifolia</i> A. Cunn.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Singhal, V. K., B. S. Gill & S. S. Bir. 1980.
		<i>S. chicha</i> A. St.-Hil. ex Turpin	40	Gibbs, P. E. & R. Ingram. 1982
		<i>S. coccinea</i> Roxb.	30	Pal, R. K. 1973.
		<i>S. foetida</i> L.	32	Pal, R. K. 1973.
			40	Carvalho, G. M. G., M. Guerra, G. A. d. Santos, V. C. d. Andrade & M. C. A. d. Farias. 1991
		<i>S. gutata</i> Roxb.	42	Pal, R. K. 1973.
		<i>S. rubiginosa</i> Vent.	40	Pal, R. K. 1973.
		<i>S. striata</i> A. St.-Hil. & Naudin	40	Gibbs, P. E. & R. Ingram. 1982.
		<i>S. urens</i> Roxb.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987. Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1984.
		<i>S. villosa</i> Roxb.	40	Singhal, V. K. & B. S. Gill. 1987.
Tilioideae	<i>Tilia</i>	<i>T. americana</i> var. <i>americana</i>	82	Pigott, C. D. 2002.
		<i>T. amurensis</i> subsp. <i>amurensis</i>	164	Pigott, C. D. 2002.
		<i>T. caroliniana</i> Mill.	82	Pigott, C. D. 2002.
		<i>T. chinensis</i> Maxim.	164	Pigott, C. D. 2002.
		<i>T. chingiana</i> Hu & W.C. Cheng	82	Pigott, C. D. 2002.
		<i>T. cordata</i> Mill.	82	Uhrikova, A. & T. SCHWARZOVA. 1980. Butorina, A. K. & I. A.

<i>T. dasystyla subsp. caucasica</i> (V. Engl.) Pigott	164	Pigott, C. D. & B. Francis. 1999. Pigott, C. D. 2002.
<i>T. endochrysea</i> Hand.-Mazz.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. euchlora</i> K. Koch	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. europaea</i> L.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. henryana</i> Szyszyl.	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. heterophylla</i> Vent.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. japonica</i> (Miq.) Simonk.	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. kiusiana</i> Makino & Shiras.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. mandshurica</i> Rupr. & Maxim.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. maximowicziana</i> Shirasawa	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. mexicana</i> Schltldl.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. miqueliana</i> Maxim.	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. mongolica</i> Maxim.	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. nobilis</i> Rehder & E.H. Wilson	328	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. oliveri</i> Szyszyl.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. paucicostata</i> Maxim.	164	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. platyphyllos</i> (Bess.) Schneid.	82	Pigott, C. D. 2002.
<i>T. tomentosa</i> Moench	82	Pigott, C. D. 2002.
	120- 124- 140- 146	Butorina, A. K. & I. A. Gavrilov. 2001. Pigott, C. D. 2002.
<i>T. tuan</i> Szyszyl.	164	Pigott, C. D. 2002.

Considerações Finais

A comparação da diversidade genética nas populações com sistemas reprodutivos diferentes em espécies de *Eriotheca* mostrou que populações apomíticas mantêm níveis altos de diversidade genética, semelhantes às populações sexuais. Comparações com mais populações poderiam representar melhor como realmente essas diferenças reprodutivas influenciam a diversidade genética das espécies. Apesar disso, os resultados desse estudo já indicam uma clara diferenciação entre os padrões reprodutivos nas espécies, mas ainda são necessários estudos complementares para avaliar se esse mosaico reprodutivo pode impedir o cruzamento interpopulacional. Para isso, cruzamentos entre as populações poderão ser realizados, futuramente, a fim de verificar se há barreiras reprodutivas entre essas populações.

A distribuição dos mosaicos reprodutivos e dos citótipos dessas espécies de *Eriotheca* ainda não é bem conhecida devido às dificuldades de coleta e de contagem de cromossomos dessas espécies. Por isso, a metodologia testada usando análises morfométricas dos grãos de pólen e dos estômatos é importante e mostrou-se eficiente para estimar a ploidia, possibilitando estudos futuros numa escala regional.

O número cromossômico apesar de ser uma análise difícil nestas plantas, por serem pequenos e numerosos, mostrou-se eficiente e importante. Nesse trabalho, foi possível perceber que há uma duplicação cromossômica importante e característica da subfamília Bombacoideae diferente das demais subfamílias da família Malvaceae, indicando que estudos filogenéticos futuros devem considerar e avaliar essa característica. São ainda necessários mais estudos de documentação do número cromossômico, principalmente, em espécies de Bombacoideae devido aos citótipos já documentados em algumas espécies.