



**Estudos cromossômicos e reprodutivos em
espécies de *Mesosetum* Steud.
(Poaceae: Paspaleae)**

André Rodolfo de Oliveira Ribeiro

2016

**Estudos cromossômicos e reprodutivos em espécies de *Mesosetum*
Steud. (Poaceae: Paspaleae)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de Brasília (UnB), como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutor em Botânica.

Aluno: André Rodolfo de Oliveira Ribeiro

Orientador: Profa. Dra. Regina Célia de Oliveira - UnB

**BRASÍLIA - DF
DEZEMBRO/2016**

Estudos cromossômicos e reprodutivos em espécies de *Mesosetum*

Steud. (Poaceae: Paspaleae)

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regina Célia de Oliveira, UnB
Presidente (Orientadora)

Profa. Dra. Carolyn Elinore Barnes Proença, UnB
Membro titular

Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza, UFPE
Membro titular

Profa. Dra. Marisa Toniolo Pozzobon, EMBRAPA
Membro titular

Profa. Dra. Micheline Carvalho Silva, UFVJM
Membro titular

Profa. Dra. Sueli Maria Gomes, UnB
Suplente

“A generosidade é a fonte restauradora das
doenças espirituais e orgânicas.”

Aos meus queridos pais Adail Pereira
Ribeiro e Edna Maria de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, fonte inspiradora de todos os aprendizados. Pela confiança e oportunidade de fornecer minha singela contribuição ao progresso da ciência e da humanidade. A todos os espíritos dos planos superiores que me forneceram aprendizado.

Aos meus queridos pais Adail Pereira Ribeiro e Edna Maria de Oliveira, por me acolherem em família e pelo apoio incondicional aos meus estudos e trabalhos terrenos.

À Profa. Regina Célia de Oliveira por me acolher como aluno e aprendiz de botânica nestes 10 anos de caminhada. Por me confiar, indicar e fornecer parceria com os melhores cientistas da área.

Ao prof. Gustavo Souza pela confiança, pelos ensinamentos em citogenética e citometria, por me acolher no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, no qual tive a oportunidade de conhecer prof. Marcelo Guerra e profa. Andréa Pedrosa-Harand. Ainda ao prof. Gustavo pela oportunidade de fazer cursos e aprofundar no doutorado o conhecimento de citogenética que desenvolvi no mestrado. Por me apresentar à profa. Magdalena Vaio, a quem tenho muita admiração pelos trabalhos de citogenética em Poaceae e tive a honra de conhecer.

A todos os amigos que fiz no Lab. Citovegetal, que me acompanharam incansavelmente no aprendizado, Tiago Ribeiro, André Marques, Lucas, Jéssica, Brena, Mariela, Mariana, Lívia, Dani, Thallitha, Duda, Pablo, Tiago Esposito, Karol, Marcus, Sandra.

À profa. Andréa Pedrosa-Harand pela confiança e oportunidade concedida de participar do curso de Citometria de Fluxo com Dr. Joerg Fuchs e Dr. Andreas Houben que ocorreu no Lab. Citogenética e Evolução Vegetal. Este curso foi importantíssimo para o enriquecimento da minha tese.

Conhecer o Andreas Houben, o pesquisador que orientou os trabalhos de FISH da espécie de *Zingeria* com $2n = 8$ cromossomos, ir comer churrasco com ele e perceber uma pessoa extremamente competente e simples ao mesmo tempo foi surreal pra mim, um sonho que jamais imaginaria realizar dentro do Brasil, pertinho de casa no nordeste, em Recife. Algumas coisas acontecem e realmente não são coincidências.

Ao meu querido amigo Artur Fonseca, pelos ensinamentos em citogenética vegetal e pelos auxílios inestimáveis nos meus perrengues aqui de Brasília. Por me apresentar ao prof. Gustavo e ajudar a viabilizar minha ida a Recife. Relutei em ir e depois que cheguei a Recife não queria mais nem voltar (rsrsr). Esta viagem pra Recife foi muito importante pessoalmente para me descobrir e traçar projetos de vida futuros.

Às colegas de curso e amigas Priscila Alves dos Reis e Anátria Stéphanie da Silva pelo auxílio nas etapas de campo, elaboração de pranchas e fotos e discussão. Sem o apoio de vocês o trabalho não teria sido concluído.

A minha amiga Gláucia Figueiró, por ir na loja sede da Sigma em São Paulo brigar pelo último frasco de iodeto propídio (rsrsrsr), sem o qual a citometria de fluxo não teria sido concluída. Por me inspirar na discussão e no andamento do trabalho, com seu exemplo de não se abater mesmo enfrentando um câncer no meio da sua tese de doutorado.

Ao meu querido amigo Antonio Gabriel, pela parceria nos trabalhos de citogenética desenvolvidos na UnB, por me ajudar a cuidar das mudas, sempre muito prestativo.

Ao meu querido amigo Jair Faria que no seu carro pessoal ajudou a fazer expedições de coleta comigo, quando o carro oficial da UnB estava quebrado para saídas de campo. Com sua parceria e experiência no campo encontrei *Mesosetum gibbosum*, *M. ferrugineum*, *M. rottboellioides*, *M. cayennense*, *M. comatum*, *Tatianyx arnacites* e minha tese deu salto substancial. Por auxiliar sempre trazendo coletas de gramíneas e às vezes até algumas mudas.

À minha amiga Janae Milion, pelos auxílios quando tive dificuldade em traduzir textos em língua inglesa. À minha amiga Jéssika Vieira, pela companhia e por segurar as pontas no herbário nos momentos finais da tese, quando tive que investir maior esforço na redação e análise dos dados do doutorado.

A todos aqueles que contribuíram com o andamento deste trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e motivação sempre! Vó Aurinha, vó Raimunda, vô Domicio, meus irmãos Aldo, Andréa, Aline e Suelen, tia Gorete, tia Maria Gomes, tia Evandissa, primo Ricardo, tia Adriana, primos Isaac, Bruno, Jacob, Rodolfo e Paulo Henrique, primas Carla, Daniela e Fernandinha (minha Júlia Roberts brasileira), tia Ednelvia, tia Edvânia, tio Fred. Minhas sobrinhas fofurinhas Maria Clara e Maria Sofia.

Aos meus amigos Bruna Ilha, Renata Costa, Phillip, Kadja Milena, Leo Resende, Fernanda, por todo o apoio e motivação sempre.

Resumo

Em Poaceae, a subfamília Panicoideae possui cerca de 3500 espécies e é a mais diversa nas regiões tropicais. Os números cromossômicos básicos $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$ e genomas pequenos ($2C/2n = 0,1$ pg) predominam entre as espécies de Panicoideae. Os diploides têm meiose estável e alta viabilidade polínica, enquanto os poliploides apresentam viabilidade polínica variável e diretamente relacionada ao índice meiótico. *Mesosetum* Steud. possui 25 espécies e é o único gênero neotropical de Panicoideae com registro do número cromossômico $2n = 8$ ($x = 4$), cuja origem a partir de $x = 10$, também encontrado no gênero, ainda não foi elucidada. O objetivo da presente tese de doutorado foi obter dados sobre número e morfologia cromossômica, tamanho do genoma e fertilidade do pólen e relacioná-los à árvore filogenética molecular de *Mesosetum*. Os dados sobre número cromossômico e tamanho do genoma foram obtidos em 20 acessos e 13 espécies de Paspaleae, sendo uma espécie de *Arthropogon* Nees, 10 espécies de *Mesosetum*, uma espécie de *Spheneria* Kuhlm. e uma espécie de *Tatianyx* Zuloaga & Soderstr. O número cromossômico $2n = 26$ ($x = 13$) observado em *M. exaratum* (Trin.) Chase é aqui registrado pela primeira vez na subfamília Panicoideae. Em *Mesosetum*, é possível reconhecer pelo menos três linhagens relacionadas a distintos números cromossômicos. O clado com número cromossômico básico $x = 10$ é provavelmente o mais basal em *Mesosetum* e, a partir do qual, se derivaram o clado com $x = 4$ e a linhagem monoespecífica com $x = 13$. O clado com $x = 4$ provavelmente se derivou por fusão ou rearranjos cromossômicos. Os cromossomos das espécies com $2n = 8$, $2n = 16$ e $2n = 24$ mostraram sinais de DNAr 5S e 45S que confirmaram a ocorrência de poliploidia no clado $x = 4$. Os dados de citometria de fluxo sugerem que o clado com $x = 10$ manteve genoma pequeno ($2C/2n = 0,04$ a $0,1$ pg) com cromossomos menores ($1,8-4,0$ μm). No clado com $x = 4$ e na linhagem monoespecífica com $x = 13$ provavelmente ocorreu uma expansão do tamanho do genoma após os eventos de disploidia descendente. Foi verificada uma redução

do genoma dos poliploides naturais, sugerindo que já houve algum grau de diploidização após o evento de poliploidização. Esta diploidização também suporta a estabilidade meiótica e alta fertilidade do pólen observadas na maioria dos poliploides de *Mesosetum*.

Palavras-chaves: citogenética, Panicoideae, citometria de fluxo, reprodução

Abstract

In Poaceae, the subfamily Panicoideae contains approximately 3500 species and is the most diverse grass subfamily of tropical regions. The basic chromosome numbers of $x = 5$, $x = 9$, $x = 10$, and small genomes ($2C/2n = 0.1$ pg) are predominant among Panicoideae species. Diploids have stable meiosis and high pollen viability, while polyploids have variable pollen viability, which is directly related to the meiotic index. *Mesosetum* Steud. is composed of 25 species and is the only neotropical genus of Panicoideae with a registered chromosome number of $2n = 8$ ($x = 4$). The origin of $x = 4$ basic chromosome number from $x = 10$, which also found within the genus, is still unknown. The aim of the present doctoral thesis was to obtain data about chromosome number and morphology, genome size, pollen fertility, and to relate to the molecular phylogenetic tree of *Mesosetum*. The data concerning chromosome number and genome size were obtained from 20 accessions and 13 species, including one species of *Arthropogon* Nees, 10 species of *Mesosetum*, one species of *Spheneria* Kuhl., and one species of *Tatianyx* Zuloaga & Soderstr. The chromosome number of $2n = 26$ ($x = 13$), found in *M. exaratum* (Trin.) Chase, is registered here for the first time for the subfamily Panicoideae. In *Mesosetum*, at least three lineages can be possible related through distinct basic chromosome numbers. The clade with the basic chromosome number of $x = 10$ is probably the most basal in *Mesosetum*, from which $x = 4$ clade and $x = 13$ monospecific lineage were derived. The $x = 4$ clade was probably derived via fusion or chromosomal rearrangements. The chromosomes of the species with $2n = 8$, 16, and 24 showed signals of

5S and 45S rDNA that confirmed the occurrence of polyploidy in the $x = 4$ clade. The flow cytometry data suggest that a small genome size ($2C/2n = 0.04$ a 0.1 pg) and the smallest chromosomes of the genus ($1.8-4.0 \mu\text{m}$) were conserved in the $x = 10$ clade. In the $x = 4$ clade and $x = 13$ lineage, a genome size expansion probably occurred after events of descending disploidy. A decrease in the genome size was verified in natural polyploids, suggesting that some level of diploidization occurred after the polyploidization event. This diploidization also supports the meiotic stability and high pollen fertility observed in the majority of *Mesosetum* polyploids.

Keywords: cytogenetic, Panicoideae, flow cytometry, reproduction

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
A variação dos números cromossômicos em Poaceae e sua evolução	1
O gênero <i>Mesosetum</i> e sua variação de números cromossômicos	4
Referências	7
CAPÍTULO 1: Estudos cromossômicos em espécies de <i>Mesosetum</i> Steud. (Poaceae: Paspaleae) e gêneros relacionados	12
1.1 Introdução	13
1.2 Material e Métodos	16
1.3 Resultados	19
1.4 Discussão	28
1.5 Conclusão	34
1.6 Referências	34
CAPÍTULO 2: Estudos de citometria de fluxo e tamanho do genoma em espécies de <i>Mesosetum</i> Steud. (Poaceae: Paspaleae) e outros gêneros de Arthropogoninae	43
2.1 Introdução	44
2.2 Material e Métodos	47
2.3 Resultados	50
2.4 Discussão	54
2.5 Conclusão	60
2.6 Referências	60

CAPÍTULO 3: Estudos de citogenética molecular em espécies de <i>Mesosetum</i> sect. <i>Bifaria</i> (Hack.) Chase (Poaceae: Arthropogoninae)	66
3.1 Introdução	67
3.2 Material e Métodos	70
3.3 Resultados	73
3.4 Discussão	77
3.5 Conclusão	80
3.6 Referências	80
CAPÍTULO 4: Estudos de viabilidade polínica em espécies de <i>Mesosetum</i> Steud. (Poaceae: Paspaleae).....	87
4.1 Introdução	88
4.2 Material e Métodos	89
4.3 Resultados	91
4.4 Discussão	93
4.5 Conclusão	94
4.6 Referências	94
CONCLUSÕES GERAIS DA TESE	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Espécies e acessos de *Mesosetum* com metáfases mitóticas avaliadas em dupla coloração com CMA-DAPI..... 18

Tabela 2. Números cromossômicos observados em espécies de Arthropogoninae e Paspalinae 20

Tabela 3. Variação do tamanho cromossômico entre os cromossomos observados em metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* e *Tatianyx* 27

Tabela 4. Espécies de Poaceae com $2n = 26$ cromossomos de acordo com a base de dados de Goldblatt & Johnson (2016) e enriquecida com revisão de literatura da presente tese de doutorado..... 28

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Discriminação das espécies de *Mesosetum* e outros gêneros de Arthropogoninae com respectivos acessos e locais de coleta utilizados nas análises de citometria de fluxo 48

Tabela 2. Quantidade de DNA do genoma diplofásico ($2C$) das espécies de *Arthropogon*, *Mesosetum* e *Tatianyx* estimadas por citometria de fluxo, seus respectivos números cromossômicos, nível de ploidia, quantidade de DNA do genoma monoploide (Cx) e quantidade média de DNA por cromossomo ($2C/2n$)..... 51

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Espécies de *Mesosetum* e respectivos acessos caracterizados via citogenética molecular..... 70

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Discriminação das espécies e acessos de *Mesosetum* com viabilidade polínica avaliada..... 90

Tabela 2. Viabilidade polínica e Índice Meiótico em espécies de *Mesosetum* 91

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Células em meiose mostrando os cromossomos de espécies de Arthropogoninae e Paspalinae..... 22
- Figura 2.** Células em mitose coradas com DAPI mostrando os cromossomos de espécies de Arthropogoninae..... 23
- Figura 3.** Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* com $x = 10$ e $x = 13$ coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul)..... 24
- Figura 4.** Dados de número cromossômico do presente trabalho enriquecidos por revisão de literatura e plotados na árvore filogenética das espécies de *Mesosetum* elaborada por Silva (dados não publicados) baseada em análise bayesiana combinada dos marcadores ITS, *trnL-F*, *psbA-trnH* e *matK*..... 25

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Histogramas das quantidades de DNA (2C) relativas obtidas de núcleos isolados em tecidos de folhas jovens em espécies de Arthropogoninae com número cromossômico básico $x = 10$ 53
- Figura 2.** Histogramas das quantidades de DNA (2C) relativas obtidas de núcleos isolados em tecidos de folhas jovens em espécies de *Mesosetum* com números cromossômicos básicos $x = 10$ e $x = 13$ 54

CAPÍTULO 3

- Figura 1.** Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 8$ e $2n = 16$ cromossomos após hibridização *in situ* com DNAr 5S (fluorescente em alaranjado) e DNAr 45S (fluorescente em verde) com contracoloração em DAPI (cinza) vistas em microscópio com epifluorescência..... 74
- Figura 2.** Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 24$ cromossomos após hibridização *in situ* com DNAr 5S (fluorescente em alaranjado) e DNAr

45S (fluorescente em verde) com contracoloração em DAPI (cinza) vistas em microscópio com epifluorescência..... 74

Figura 3. Idiogramas das espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 8$ e $2n = 16$ cromossomos com sítios de DNAr 5S (laranja), DNAr 45S (verde) e bandas DAPI (cinza)..... 75

Figura 4. Idiogramas das espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 24$ cromossomos com sítios de DNAr 5S (laranja), DNAr 45S (verde) e bandas DAPI (cinza)..... 75

CAPÍTULO 4

Figura 1. Grãos de pólen corados com carmim acético em espécies de *Mesosetum* 92

INTRODUÇÃO GERAL

A variação dos números cromossômicos em Poaceae e sua evolução

Poaceae é uma das maiores famílias de angiospermas com cerca de 700 gêneros e 12000 espécies distribuídas desde o equador até as zonas polares (Watson & Dallwitz 2016). A evolução das espécies de Poaceae seguiu uma sequência de eventos de aumento e redução do genoma (Hunziker & Stebbins 1987; Leitch *et al.* 2010; Soreng *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015). Enquanto o aumento do genoma ocorreu relacionado à poliploidia, a redução do genoma processou-se paralela à diploidização (Hilu 2004; Kellog & Benetzen 2004; Parteson *et al.* 2004; Schnable *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015; Studer *et al.* 2016).

Este modelo evolutivo acarretou uma ampla diversidade de tamanho e números cromossômicos entre as distintas subfamílias de Poaceae (Schapova 2012). São reportados números básicos variando de $x = 2$ a $x = 18$, com números somáticos desde $2n = 4$ a $2n = 263-265$ (De Wet 1987, Hilu 2004, Schapova 2012).

Anomochlooideae, a subfamília mais basal de Poaceae, inclui quatro espécies pertencentes a dois gêneros florestais endêmicos dos Neotrópicos (*Anomochloa* Brongn. e *Streptochaeta* Schrad. ex Nees) e reporta os números cromossômicos básicos $x = 11$ ou $x = 18$ (GPWG 2001; Hilu 2004; Soreng *et al.* 2015).

Pooideae possui cerca de 4200 espécies e é a mais diversa entre as regiões temperadas e as zonas polares ártica e antártica (GPWG 2001; Soreng *et al.* 2015; McKeown *et al.* 2016). A subfamília Pooideae é peculiar pela alta diversidade de números cromossômicos básicos (GPWG 2001; Hilu 2004; Schapova 2012). O número básico $x = 7$ é predominante em Pooideae, porém ainda são reportados desde $x = 2$ até $x = 13$ (Kotseruba *et al.* 2003; Hilu 2004; Cremonini *et al.* 2003; Schapova 2012;). Eventos dispoloides resultaram em uma extrema redução do número cromossômico nos gêneros *Zingeria* P.A. Smirn. e *Colpodium* Trin. com $2n = 4$ ($x = 2$), o qual é o menor número cromossômico conhecido entre as angiospermas (Cremonini *et al.* 2003; Hilu 2004). O maior número cromossômico de Poaceae

e mais alto nível de ploidia também foram registrados na subfamília Pooideae, em *Poa litorosa* Cheeseman com $2n = 263-265$ e nível 38-ploide com $x = 7$ (Hunziker & Stebbins 1987). Essa diversidade é atribuída aos extremos ambientais de frio e calor nas regiões temperadas, que interferem na formação dos fusos e acarretam irregularidades mitóticas e meióticas, gerando descendentes com números cromossômicos distintos dos parentais (Hilu 2004, Amosova *et al.* 2015).

Panicoideae é a subfamília mais diversa na zona tropical e possui cerca de 3500 espécies (GPWG 2001; Soreng *et al.* 2015; Burke *et al.* 2016). Panicoideae tem como números cromossômicos básicos mais freqüentes $x = 9$ e $x = 10$, mas ainda há registros de $x = 3-8$, $x = 11-12$ e $x = 14$ (Celarier & Paliwal 1957, Rao 1975; De Wet 1987; GPWG 2001; Hilu 2004; Morrone *et al.* 2006; Sede *et al.* 2010; Goldblatt & Johnson 2016).

No entanto, em algumas subfamílias os padrões de número e evolução cromossômica permanecem pouco compreendidos pela carência de informação. A ausência de contagens cromossômicas é evidente em significativo número de espécies distribuídas pelos Trópicos e Subtrópicos (Honfi *et al.* 1991, Sede *et al.* 2010) e ainda mais relevante é a carência de estudos avançados via citogenética molecular e ensaios reprodutivos que investiguem o grau de homeologia dos cromossomos entre espécies relacionadas. Por este motivo, para se compreender a origem e tendência de evolução dos números cromossômicos em Poaceae ainda são requeridos muitos estudos citogenéticos.

A tendência de evolução cromossômica em Poaceae, conforme avalia De Wet (1987), é dos maiores grupos terem se derivado independentemente de um complexo original de espécies com $x = 5$, $x = 6$ e $x = 7$. Após um processo de diploidização no nível tetraploide, surgiram os números básicos secundários de $x = 10$, $x = 12$ e $x = 14$.

Hilu (2004), investigando a relação dos gêneros mais basais de Poaceae, *Anomochloa* e *Streptochaeta*, com os grupos irmãos representados pelas famílias Ectociaceae,

Joinvilleaceae e Restionaceae, cita $x = 11$ como número básico ancestral de Poaceae, a partir do qual derivou-se $x = 12$, o qual também é encontrado em outras gramíneas basais.

Murat *et al.* (2010) reconstruiu o cariótipo ancestral de Poaceae e das subfamílias Ehrhartoideae (atualmente em Oryzoideae), Panicoideae e Pooideae, avaliando espécies com genoma totalmente sequenciado e dados citogenéticos. Conforme o modelo de Murat *et al.* (2010) cinco protocromossomos ($x = 5$) originaram por poliploidização, duplicação e rearranjos o cariótipo ancestral de Poaceae com $x = 12$, corroborando a hipótese de De Wet (1987) e parcialmente a hipótese de Hilu (2004). As diferenças nas análises podem refletir o fato de Murat *et al.* (2010) não ter utilizado representantes basais da subfamília Anomochloideae nem das famílias Ectocoleaceae, Joinvilleaceae e Restionaceae, que são grupos irmãos de Poaceae.

Schapova (2012) formulou a hipótese de que o número cromossômico básico ancestral de Poaceae poderia ser $x = 1, 2$ ou 3 , o qual evoluiu a partir de euploidia, disploidia e hibridização. Entretanto, Schapova (2012) não cita a relação de $x = 1-3$ com os grupos irmãos de Poaceae, nem releva o fato de os gêneros e espécies mais basais de Poaceae registrarem como números básicos $x = 11$ e $x = 18$.

Na subfamília Panicoideae, a hipótese de evolução cromossômica sugere que $x = 11$ é o número básico ancestral desta subfamília, encontrado no monotípico basal representado por *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P. Beauv. (Hilu 2004). A partir de $x = 11$ se derivaram sucessivamente por redução os números $x = 10$, $x = 9$ e $x = 5$ (Hilu 2004). Após eventos de aloploidia o número básico de $x = 10$ foi restaurado a partir de $x = 5$ (Hilu 2004, Murat *et al.* 2010). Embora $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$ sejam os números cromossômicos predominantes em Panicoideae, são reportados números cromossômicos mais raros como $x = 3$ e $x = 4$ (Celarier & Paliwal 1957; Rao 1975; De Wet 1987; GPWG 2001; Hilu 2004; Goldblatt & Johnson 2016). Os números básicos $x = 3$ e $x = 4$ ($2n = 6$ e $2n = 8$) são também os mais baixos já

registrados entre as gramíneas tropicais, sendo reportados unicamente no gênero *Iseilema* Andersson (tribo Andropogoneae) e *Mesosetum* Steud. (tribo Paspaleae) (Celarier & Paliwal 1957; Rao 1975; De Wet 1987; Morrone *et al.* 2012; Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). No caso dos números mais reduzidos $x = 3$ e $x = 4$ registrados no gênero *Iseilema* teriam derivado a partir de um $x = 5$ provavelmente por perda de centrômeros e rearranjos cromossômicos (Rao 1975). Em *Mesosetum*, a origem de $x = 4$ ainda é desconhecida (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015).

O gênero *Mesosetum* foi posicionado na tribo Paspaleae e na subtribo Arthropogoninae (Morrone *et al.* 2012). Entre seus gêneros, *Mesosetum* é o que apresenta maior diversidade. Dentro de Arthropogoninae, *Mesosetum* forma um clado altamente suportado com os gêneros monoespecíficos *Tatianyx* Zuloaga & Soderstr. e *Keratochlaena* Morrone (Morrone *et al.* 2012).

O gênero *Mesosetum* e sua variação de números cromossômicos

Mesosetum Steud. é um gênero neotropical que compreende 25 espécies campestres, distribuídas desde o sul do México ao nordeste da Argentina (Filgueiras 1989; Filgueiras *et al.* 2016). O Brasil é o centro de diversidade do gênero, com 22 espécies (Filgueiras 1989, Filgueiras *et al.* 2016; Silva *et al.* 2016). Morfologicamente, o gênero é reconhecido pelas inflorescências com um ramo unilateral espiciforme, espiguetas com a primeira gluma adaxial à ráquis e cariopse com hilo linear (Filgueiras 1986, 1989).

Allem & Valls (1987) e Santos *et al.* (2002) indicaram potencial forrageiro em pelo menos duas espécies, *Mesosetum loliiforme* (Hochst. ex Steud.) Chase e *M. chaseae* Luces, por sua grande capacidade de produzir estolhos e afilamento intenso. Entretanto, no Brasil os estudos com forrageiras nativas ainda são incipientes (Silva 2008), e ainda carecem de informações técnicas que atestem com maior precisão seu potencial forrageiro.

A primeira revisão para *Mesosetum* foi feita por Swallen (1937), que considerou 33 espécies no gênero. Swallen (1937) baseou seu estudo em grande número de coletas pelo Brasil e propôs a subdivisão de *Mesosetum* em seis seções (*Annua* Swallen, *Bifaria* (Hack.) Chase, *Fulva* Swallen, *Loliiformia* Swallen, *Penicillata* Swallen e *Schlerochloae* Swallen) e mais um conjunto de sete espécies denominado “ungrouped species”.

A última revisão taxonômica de *Mesosetum*, proposta por Filgueiras (1986), reconheceu 25 espécies em *Mesosetum*, agrupando-as em cinco seções: *Bifaria* (Hack.) Chase, *Loliiformia* Swallen, *Mesosetum*, *Penicillata* Swallen e *Schlerochloae* Swallen. Filgueiras (1986) elaborou uma árvore evolutiva das espécies de *Mesosetum* com base em caracteres morfológicos. A seção *Penicillata* foi posicionada por Filgueiras (1986) no clado mais basal e a seção *Bifaria* no mais derivado, com as espécies da seção *Loliiformia* apresentando morfologia intermediária.

As primeiras informações de número cromossômico para o gênero encontradas na literatura eram restritas a três espécies: *Mesosetum chaseae*, *M. loliiforme* e *M. pittieri* Hitchc., com $2n = 16$ cromossomos e $x = 8$ (Gould 1966; Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971; Davidse & Pohl 1972; Silva *et al.* 2012). Sede *et al.* (2010) citaram outro citótipo $2n = 32$ para a espécie *M. loliiforme*.

Estudos com enfoque citotaxonômico no gênero *Mesosetum* analisaram 12 espécies e revelaram diversidade acerca dos números cromossômicos, reportando pela primeira vez os números de $2n = 8$, $2n = 24$, $2n = 20$ e $2n = 60$ cromossomos (Ribeiro 2013, Sousa 2014, Ribeiro *et al.* 2015). Estes resultados sugerem pelo menos dois números cromossômicos básicos ($x = 4$ e $x = 10$) para o gênero.

Uma árvore filogenética incluindo 24 espécies de *Mesosetum* e outros gêneros externos está sendo elaborada com base nos marcadores moleculares ITS (*Internal Transcriber Spacer*), *trnL-F*, *psbA-trnH* e *matK* (Silva dados não publicados). Os resultados

parciais deste estudo molecular mostram pelo menos dois clados correspondentes aos dois números cromossômicos básicos $x = 4$ e $x = 10$. O gênero *Tatianyx* ocupa ramo dentro do clado das espécies de *Mesosetum* (Silva dados não publicados). A síntese dos estudos citogenéticos combinados aos dados moleculares sugerem que a redução do número cromossômico e a poliploidia atuaram na evolução das espécies de *Mesosetum*. A maior parte dos poliploides de *Mesosetum* apresentam meiose estabilizada e alta viabilidade polínica, sugerindo que já se processou algum grau de diploidização ou redução do tamanho do genoma nos poliploides.

Buscando verificar estas hipóteses, o principal objetivo desta tese de doutorado foi realizar estudos citogenéticos e reprodutivos por meio de análises dos cromossomos, citometria de fluxo e viabilidade polínica no maior número possível de espécies de *Mesosetum*, bem como em alguns representantes de outros gêneros de Paspaleae.

Para organização do texto, a presente tese de doutorado foi dividida em quatro capítulos, o primeiro sobre números e morfologia dos cromossomos, o segundo sobre citometria de fluxo, o terceiro sobre citogenética molecular e o quarto sobre viabilidade polínica. A formatação geral do texto baseou-se nas normas da revista “Plant Systematics and Evolution”

Referências

- Allem AC, Valls JFM (1987) Recursos forrageiros nativos do pantanal Matogrossense. EMBRAPA/DID: EMBRAPA/CENARGEN, Documentos 8
- Amosova AV, Bolsheva NL, Samatadze TE, Twardovska MO, Zoshchuk SA, Andreev IO, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. PLoS ONE 10(9): 1-17
- Burke SV, Wysocki WP, Zuloaga FO, Craine JM, Pires JC, Edger PP, Mayfield-Jones D, Clark LG, Kelchner SA, Duvall MR (2016) Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (Panicoideae; Poaceae). BMC Plant Biology 16(140): 1-11
- Celarier R, Paliwal R (1957) Basic chromosome number of four in the subfamily Panicoideae of the Gramineae. Science 126: 1247
- Cremonini R, Ruffini Castiglione M, Grif VG, Kotseruba VV, Punina EO, Rodionov AV, Muravenko OV, Popov KV, Samatadze TE, Zelenin AV (2003) Chromosome banding and DNA methylation patterns, chromatin organisation and nuclear DNA content in *Zingeria biebersteiniana*. Biologia Plantarum 46: 543-550
- Cremonini R (2005) Low chromosome number angiosperms. Caryologia 58(4): 403-409
- Davidse G, Pohl RW (1972) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and the West Indies. Canadian Journal of Botany 50: 1441-1452
- De Wet JMJ (1987) Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) Grass systematics and evolution, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, pp 188-194
- Filgueiras TS (1986) O gênero *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil

- Filgueiras TS (1989) Revisão de *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). *Acta Amazônica* 19: 47-114
- Filgueiras TS, Silva AS, Oliveira RC (2016) *Mesosetum* In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13355>, Accessed 18 Jan. 2016
- Goldblatt P, Johnson DE (2016) Index to plant chromosome numbers 1979-onwards. Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA. Available at: <http://www.tropicos.org/Project/PCPN>, Accessed 23 Nov. 2016
- Gould FW (1966) Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Canadian Journal of Botany* 44: 1683-1696
- Gould FW, Soderstrom TR (1967) Chromosome numbers of tropical American grasses. *American Journal of Botany* 54: 676-683
- Group GGPW (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88(3): 373-457
- Hilu K (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52: 13-22
- Honfi AI, Quarín CL, Valls JFM (1991) Estudios cariológicos en gramíneas sudamericanas. *Darwiniana* 30: 87-94
- Hunziker JH, Stebbins GL (1987) Chromosome evolution in the Gramineae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass Systematics and Evolution*, Smithsonian Inst., Washington, pp 179-187
- Kellogg EA, Bennetzen JL (2004) The evolution of nuclear genome structure in seed plants. *American Journal of Botany* 91(10): 1709-1725
- Kotseruba VV, Gernand D, Meister A, Houben A (2003) Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingieria tricopoda* ($2n = 8$). *Genome* 46: 156-163

- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome Size Dynamics and Evolution in Monocots. *Journal of Botany* ID 862516: 1-18
- McKeown M, Schubert M, Marcussen T, Fjellheim S, Preston JC (2016) Evidence for an Early Origin of Vernalization Responsiveness in Temperate Pooideae Grasses. *Plant Physiology* 172: 416–426
- Morrone O, Escobar A, Zuloaga FO (2006) Chromosome studies in American Panicoideae (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 647-657
- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA, Salaricato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Sede SM, Giussani LM, Kellogg EA, Zuloaga FO (2012) Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28: 333-356
- Murat F, Xu J-H, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research* 20: 1545-1557
- Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9903-9908
- Pohl RW, Davidse G (1971) Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia* 23: 293-324
- Rao Y (1975) Evolutionary trends in the Indian *Iseilema*. *Nature* 255: 220-221
- Ribeiro ARO (2013) Citogenética, reprodução e variabilidade morfológica de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase (Poaceae: Paniceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Ribeiro ARO, Sousa MWS, Oliveira RC, Araujo ACG, Fagg CW, Pozzobon MT (2015) Cytological studies in four species of *Mesosetum* (Arthropogoninae) reveal the lowest

- chromosome number among the Neotropical Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301(10): 2377-2386
- Santos SA, Costa C, Souza GS, Pott A, Alvarez JM, Machado SR (2002) Composição Botânica da Dieta de Bovinos em Pastagem Nativa na Sub-Região da Nhecolândia, Pantanal. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31(4): 1648-1662
- Schapova AI (2012) Evolution of the Basic Chromosome Number in Poaceae Barnh. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 2(3): 252-259
- Schnable JC, Freeling M, Lyons E (2012) Genome-Wide Analysis of Syntenic Gene Deletion in the Grasses. *Genome Biology and Evolution* 4(3): 265-277
- Sede S, Escobar A, Morrone O, Zuloaga FO (2010) Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae-Panicoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 128-138
- Silva AS, Villarroel D, Ribeiro ARO, Oliveira RC (2016) Eleven new records of little known taxa of *Mesosetum* and *Paspalum* (Poaceae) from Brazil and Bolivia. *Phytotaxa* 268(1): 069-079
- Silva AS (dados não publicados) Filogenia de *Mesosetum* Steud. (Paspaleae: Poaceae) com base caracteres moleculares. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Silva LAC (2008) Qualidade de sementes da grama-do-cerrado (*Mesosetum chaseae* Luces) na subregião da Nhecolândia, Pantanal, MS. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, Brazil
- Silva LAC, Pagliarini MS, Santos SA, Silva N, Souza VF (2012) Chromosome number, microsporogenesis, microgametogenesis, and pollen viability in the Brazilian native grass *Mesosetum chaseae* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4100-4109

- Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Zuloaga FO, Judziewicz EJ, Filgueiras TS, Davis JJ, Morrone O (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *Journal of Systematics and Evolution* 53(2): 117–137
- Sousa MWS (2014) Citogenética e morfologia de espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae, Paspaleae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Studer AJ, Schnable JC, Weissmann S, Kolbe AR, McKain MR, Shao Y, Cousins AB, Kellogg EA, Brutnell TP (2016) The draft genome of the C3 panicoid grass species *Dichanthelium oligosanthes*. *Genome Biology* 17(223): 1-18
- Swallen JR (1937) The grass genus *Mesosetum*. *Brittonia* 2(4): 363-392
- Wang X, Wang J, Jin D, Guo H, Lee T-H, Liu T, Paterson AH (2015) Genome Alignment Spanning Major Poaceae Lineages Reveals Heterogeneous Evolutionary Rates and Alters Inferred Dates for Key Evolutionary Events. *Molecular Plant* 8: 885-898
- Watson L, Dallwitz MJ (2016) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval 1992-onwards. Gramineae. Version 19 Oct. 2016. Available at: <http://delta-intkey.com/angio/www/graminea.htm>, Accessed 01 Nov. 2016
- Zhao Y, Tang L, Li Z, Jin J, Luo J, Gao G (2015) Identification and analysis of unitary loss of long-established protein-coding genes in Poaceae shows evidences for biased gene loss and putatively functional transcription of relics. *BMC Evolutionary Biology* 15(66): 2-10

CAPÍTULO 1

Estudos cromossômicos em espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae: Paspaleae) e gêneros relacionados

1.1 Introdução

Panicoideae é a subfamília mais diversa na região tropical com cerca de 3500 espécies (GPWG 2001; Soreng *et al.* 2015; Burke *et al.* 2016). A evolução do genoma das espécies de Panicoideae está diretamente relacionada a eventos de aumento seguidos de redução do número cromossômico por meio de aloploidia, autopoliploidia e rearranjos no cariótipo (Hilu 2004; Parteson *et al.* 2004; Murat *et al.* 2010; Wang *et al.* 2015; Zhao *et al.* 2015; Studer *et al.* 2016).

Embora $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$ sejam os números cromossômicos predominantes em Panicoideae, são reportados números cromossômicos mais raros como $x = 3$ e $x = 4$ (Celarier & Paliwal 1957; Rao 1975; De Wet 1987; GPWG 2001; Hilu 2004; Goldblatt & Johnson 2016). Os números básicos $x = 3$ e $x = 4$ ($2n = 6$ e $2n = 8$) são também os mais baixos já registrados entre as gramíneas tropicais, sendo reportados unicamente no gênero *Iseilema* Andersson (tribo Andropogoneae) e *Mesosetum* Steud. (tribo Paspaleae) (Celarier & Paliwal 1957; Rao 1975; De Wet 1987; Morrone *et al.* 2012; Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). Em *Mesosetum*, a origem de $x = 4$ ainda é desconhecida (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015).

O gênero *Mesosetum* foi posicionado na tribo Paspaleae, subtribo Arthropogoninae na última filogenia da tribo Paniceae *s.l.* (Morrone *et al.* 2012). A tribo Paspaleae engloba espécies americanas que compõe um clado com número cromossômico básico $x = 10$ (Morrone *et al.* 2012).

A subtribo Arthropogoninae é composta por gêneros heterogêneos do ponto de vista morfológico, na qual *Mesosetum* tem maior diversidade de espécies (Filgueiras 1986, 1989; Morrone *et al.* 2012; Filgueiras *et al.* 2016). Dentro de Arthropogoninae, *Mesosetum* compõe um clado altamente suportado com os gêneros monoespecíficos *Keratochlaena* Morrone e *Tatianyx* Zuloaga & Soderstr. (Morrone *et al.* 2012).

A maioria dos gêneros de Arthropogoninae possui registro de números cromossômicos múltiplos de $x = 10$, que também é o número cromossômico básico da tribo Paspaleae (Morrone *et al.* 2012). Entretanto, estas informações ainda são restritas a *Homolepis aturensis* (Kunth) Chase ($2n = 20$), *H. isocalycia* (G. Mey.) Chase ($2n = 40$), *Phanopyrum gymnocarpon* (Elliott) Nash ($2n = 40$) e *Tatianyx arnacites* (Trin.) Zuloaga & Soderstr. ($2n = 60$) (Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971; Kessler & Hatch 1984; Morrone *et al.* 1995).

O gênero *Mesosetum* é o único gênero de Arthropogoninae que possui representantes com números cromossômicos básicos diferentes de $x = 10$. As primeiras informações sugeriam número básico $x = 8$ para o gênero e eram restritas a três espécies: *Mesosetum chaseae* Luces ($2n = 16$), *M. loliiforme* (Hochst. ex Steud.) Chase ($2n = 16$ e 32) e *M. pittieri* Hitchc. (Gould 1966; Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971; Davidse & Pohl 1972; Sede *et al.* 2010; Silva *et al.* 2012).

Estudos com enfoque citotaxonômico no gênero *Mesosetum* ampliaram o conhecimento acerca do número cromossômico para 13 espécies (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). Os novos dados revelaram a ocorrência de mais dois números cromossômicos básicos em *Mesosetum* ($x = 4$ e $x = 10$) associados a dois grupos distintos de espécies.

O número cromossômico básico $x = 10$ foi observado nas espécies de *Mesosetum* sect. *Mesosetum*, as quais formam um grupo reconhecido morfológicamente pela presença de pelos ferrugíneos nas espiguetas (Swallen 1937; Filgueiras 1986, 1989; Sousa 2014). O número básico $x = 10$ foi encontrado em *M. cayennense* Steud. ($2n = 20$) e *M. rottboellioides* (Kunth) Hitchc. ($2n = 20$) e comprovado pelo pareamento em 10 bivalentes (Sousa 2014). Em *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* (Trin.) Chase foi registrado número cromossômico $2n = 60$, também múltiplo de $x = 10$, sugerindo hexaploidia. A ocorrência de $x = 10$ evidencia a

relação de *Mesosetum* com outros gêneros de Arthropogoninae e corrobora os dados moleculares da filogenia de Paspaleae (Morrone *et al.* 2012).

O número cromossômico $2n = 8$ ($x = 4$), também encontrado em *Mesosetum*, é o menor já registrado entre as gramíneas neotropicais (Ribeiro 2013, Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). Este número foi observado em quatro espécies: *M. alatum* Filg., *M. annuum* Swallen, *M. ansatum* (Trin.) Kuhl. e *M. longiaristatum* Filg. (Ribeiro 2013, Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). O pareamento em quatro bivalentes sugeriu nível diploide para $2n = 8$ e comprovou a ocorrência de $x = 4$ em *Mesosetum* (Ribeiro 2013, Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015).

A poliploidia também parece ter atuado na evolução das espécies com $x = 4$ (Ribeiro 2013, Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). A presença de tetravalentes na meiose de *M. bifarium* (Hack.) Chase com $2n = 16$ cromossomos, embora tenha sido observada em menos de 10% das diacineses, sugeriu tetraploidia e que $x = 8$ é na verdade um número cromossômico básico secundário derivado a partir de $x = 4$ por poliploidia. Além de plantas com $2n = 16$, foram observados tetravalentes e associações múltiplas de cromossomos em espécies com $2n = 24$ e $2n = 32$, sugerindo a ocorrência de hexaploidia e octaploidia no grupo de espécies com $x = 4$ (Ribeiro 2013, Sousa 2014).

As espécies com números cromossômicos múltiplos de $x = 4$, incluindo todos os níveis de ploidia ($2n = 8$, $2n = 16$, $2n = 24$ e $2n = 32$), estão dispersas em três seções de *Mesosetum*: *Bifaria* (Hack.) Chase, *Loliiformia* Swallen e *Sclerochloae* Swallen (Filgueiras 1986, 1989). O grupo formado pela união destas três seções é bastante polimórfico e a ausência de pelos ferrugíneos é o único caractere morfológico que distingue o grupo com $x = 4$ do grupo com $x = 10$.

De acordo com a filogenia de *Mesosetum* baseada em caracteres moleculares (Silva dados não publicados), é possível reconhecer pelo menos dois clados bem suportados em *Mesosetum*, um formado pelas espécies com $x = 10$ e outro com $x = 4$. As espécies *M.*

exaratum (Trin.) Chase e *M. agropyroides* Mez são linhagens monoespecíficas cujos números cromossômicos ainda são desconhecidos. *M. exaratum* é mais estritamente relacionada ao clado com $x = 10$, enquanto *M. agropyroides* é mais estritamente relacionada ao clado com $x = 4$.

A origem de $x = 4$ a partir de $x = 10$ representa a maior redução de número cromossômico já reportada na tribo Paspaleae e ainda não foi elucidada. A ausência de informações sobre o número cromossômico de *M. exaratum*, *M. agropyroides* e outras espécies impossibilita avaliar como as mudanças no cariótipo afetaram a evolução do genoma das espécies de *Mesosetum*.

Uma ampla caracterização citogenética de *Mesosetum*, incluindo contagens cromossômicas na maioria das suas espécies, como também de outros gêneros de Arthropogoninae e Paspaleae, são fundamentais para o fornecimento de parâmetros para a reconstrução da história evolutiva de *Mesosetum* e constituem-se no principal objetivo do primeiro capítulo desta tese.

1.2 Material e Métodos

Contagens cromossômicas

Foram realizadas expedições para diferentes regiões do Brasil com o objetivo de obter inflorescências fixadas para meiose, *vouchers* de herbário e plantas vivas para realizar os estudos de citogenéticos. As mudas foram obtidas de touceiras e estão sendo cultivadas na casa de vegetação da Universidade de Brasília.

As expedições foram planejadas com base nos dados da revisão de herbários nacionais e internacionais B, BAA, BM, CAY, CEN, CPAP, ESA, F, G, HB, HEPH, HRB, HUEFS, HUTO, IAN, IBGE, ICN, IPA, K, LE, MG, MHS, MO, MOSS, NX, P, PAMG, R, RB, S, SP, SP, UB, UEC, UFMT, UFRN, US e VEM (acrônimos disponíveis em Thiers 2016), além da

base de dados do SpeciesLink (2016) para determinação tanto dos locais quanto das épocas de florescimento das espécies.

Foram realizadas coletas no Distrito Federal e estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Pernambuco e Tocantins, entre novembro de 2013 e fevereiro de 2016.

Para análise da meiose as técnicas se basearam em Souza *et al.* (2012). As inflorescências coletadas no campo ou a partir do florescimento das mudas cultivadas, foram fixadas e armazenadas a 4°C em solução 3:1 (etanol:ácido acético, v/v). A coloração foi feita com carmim-acético 2% e os cromossomos foram observados e fotografados em Microscópio LEICA na Universidade de Brasília.

Para a mitose, as pontas de raízes foram coletadas a partir do material cultivado. Foram pré-tratadas com solução antimitótica de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 20h a 10°C e fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético, v/v) em temperatura ambiente por pelo menos 2h e depois armazenadas a 4°C. O meristema foi previamente amolecido com enzima pectinase-celulase 20-2 % por 90 min a 37 °C. As lâminas foram preparadas com ácido acético 60% e selecionadas sob microscopia em contraste de fase do Microscópio LEICA para serem coradas. As lâminas com pelo menos 5 metáfases espalhadas permitindo a distinção dos cromossomos foram coradas com solução DAPI-glicerol 1/mL e observadas em Microscópio com Epifluorescência LEICA no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Os cromossomos em metáfases mitóticas foram medidos em pelo menos 5 células para estimar o tamanho mínimo e máximo dos cromossomos com auxílio do software LEICA Application Suite 4.5.

Dupla coloração CMA-DAPI

Foi realizada dupla coloração nas melhores lâminas selecionadas de sete espécies de *Mesosetum* para caracterização da heterocromatina (Tabela 1), alguns acessos com número cromossômico já registrado em trabalhos anteriores (Ribeiro 2013, Sousa 2014, Ribeiro *et al.* 2015). A técnica foi realizada de acordo com o protocolo de Guerra & Souza (2002).

Tabela 1. Espécies de *Mesosetum* com metáfases mitóticas avaliadas em dupla coloração com CMA-DAPI

Espécie	Acesso	Local de Coleta
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlm.	RCO 2766*	Brasil, Mato Grosso, Poconé
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15933	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	AROR 362	Brasil, Goiás, Pirenópolis
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	Brasil, Pernambuco, Pesqueira
<i>Mesosetum exaratum</i> (Trin.) Chase	AROR 351	Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó
<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>setaceum</i> Filg.	AROR 409	Brasil, Bahia, Rio de Contas
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331*	Brasil, Minas Gerais, Grão Mogol

* Acesso com número cromossômico já determinado em trabalho anterior.

As lâminas prontas e secas foram coradas com 8 de μL CMA (cromomicina A3) em solução a 0,5 mg/mL por 1h. Após a coloração com CMA as lamínulas foram removidas com jato de água e secas ao ar. Depois de secas, as lâminas foram coradas com 8 μL DAPI (4'-6'diamidino - 2' - fenilindol) em solução a 2 $\mu\text{g/ml}$ por 30 minutos. Após a coloração com DAPI, as lamínulas foram novamente removidas com jato de água e secas aos ar. Depois de secas as lâminas foram montadas com meio de montagem glicerol-McIlvaine e guardadas no escuro por pelo menos 3 dias até a análise (Guerra & Souza 2002).

Após a dupla coloração, as lâminas foram examinadas em Microscópio com Epifluorescência LEICA no Laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

1.3 Resultados

Números cromossômicos

Os números cromossômicos de 18 acessos foram aqui determinados incluindo 13 espécies de Paspaleae, sendo 12 espécies da subtribo Arthropogoninae e uma da subtribo Paspalinae (Tabela 2, Figuras 1, 2 e 3). Entre os gêneros de Arthropogoninae, o número cromossômico foi determinado em uma espécie de *Arthropogon* Nees, 10 espécies de *Mesosetum* e uma de *Tatianyx* (Tabela 2). Na Subtribo Paspalinae, o número cromossômico foi determinado para uma espécie do gênero *Spheneria* Kuhl. (Tabela 2).

Em sete espécies o número cromossômico foi registrado pela primeira vez: *Arthropogon villosus* Nees ($2n = 40$), *Mesosetum chlorostachyum* (Döll) Chase ($2n = 8$), *M. compressum* Swallen ($2n = 16$), *M. exaratum* (Trin.) Chase ($2n = 26$), *M. gibbosum* Renvoize & Filg. ($2n = 24$), *M. pappophorum* (Nees) Kuhl. ($2n = 8$) e *Spheneria kegelii* (Müll. Hal.) Pilg. ($2n = 20$).

Novos citótipos foram encontrados para *M. bifarium* ($2n = 8$) em plantas coletadas no município de Flores de Goiás-GO e *M. ferrugineum* var. *setaceum* Filg. ($2n = 20$) em plantas coletadas em Rio de Contas-BA (Tabela 2, Figuras 1 e 2).

Os cromossomos de *Tatianyx arnacites* (Trin.) Zuloaga & Soderstr. ($2n = 60$) foram pela primeira vez observados em mitose (Figura 2) e confirmaram a contagem anterior em outro acesso feita em meiose por Morrone *et al.* (1995).

As contagens em *M. bifarium* ($2n = 16$), *M. cayennense* Steud. ($2n = 20$), *M. elytrochaetum* (Hack.) Swallen ($2n = 24$) e *M. sclerochloa* (Trin.) Hitchc. ($2n = 16$) confirmaram, em novas populações, os números cromossômicos previamente reportados por Ribeiro (2013) e Souza (2014) (Tabela 2).

Para facilitar a interpretação e discussão dos resultados, os dados de número cromossômico do presente capítulo somados aos dados de trabalhos anteriores (Gould 1966; Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971; Davidse & Pohl 1972; Sede *et al.* 2010;

Silva *et al.* 2012; Ribeiro 2013; Souza 2014; Ribeiro *et al.* 2015) foram plotados na filogenia molecular proposta por Silva (dados não publicados) (Figura 4).

Tabela 2. Números cromossômicos observados em espécies de Arthropogoninae e Paspalinae

Espécie	Acesso	Número Cromossômico	Local de Coleta
<i>Arthropogon villosus</i> Nees	RCO 2969	2n = 40	Brasil, Distrito Federal, Brasília
<i>Arthropogon villosus</i> Nees	RCO 2971	2n = 40	Brasil, Distrito Federal, Brasília
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15927	2n = 8	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15933	2n = 8	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	AROR 391	2n = 16	Brasil, Goiás, Alto Paraíso
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	PAR 181	2n = 20	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	AROR 362	2n = 20	Brasil, Goiás, Pirenópolis
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	RCO 2848	2n = 20	Brasil, Tocantins, Natividade
<i>Mesosetum chlorostachyum</i> (Döll) Chase	RCO 3033	2n = 8	Brasil, Amazonas, Manaus
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	Brasil, Pernambuco, Pesqueira
<i>Mesosetum elytrochaetum</i> (Hack.) Swallen	AROR 377	2n = 24	Brasil, Goiás, Alto Paraíso
<i>Mesosetum exaratum</i> (Trin.) Chase	AROR 351	2n = 26	Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó
<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>setaceum</i> Filg.	AROR 409	2n = 20	Brasil, Bahia, Rio de Contas
<i>Mesosetum gibbosum</i> Renvoize & Filg.	AROR 408	2n = 24	Brasil, Bahia, Rio de Contas
<i>Mesosetum pappophorum</i> (Nees) Kuhlm.	V 15949	2n = 8	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Mesosetum sclerochloa</i> (Trin.) Hitchc.	V 15937	2n = 16	Brasil, Goiás, Flores de Goiás
<i>Spheneria kegelii</i> (Müll. Hal.) Pilg.	RCO 3007	2n = 20	Brasil, Amazonas, Manaus

Tatianyx arnacites (Trin.) AROR 411 $2n = 60$ Brasil, Bahia, Rio de
Zuloaga & Soderstr. Contas

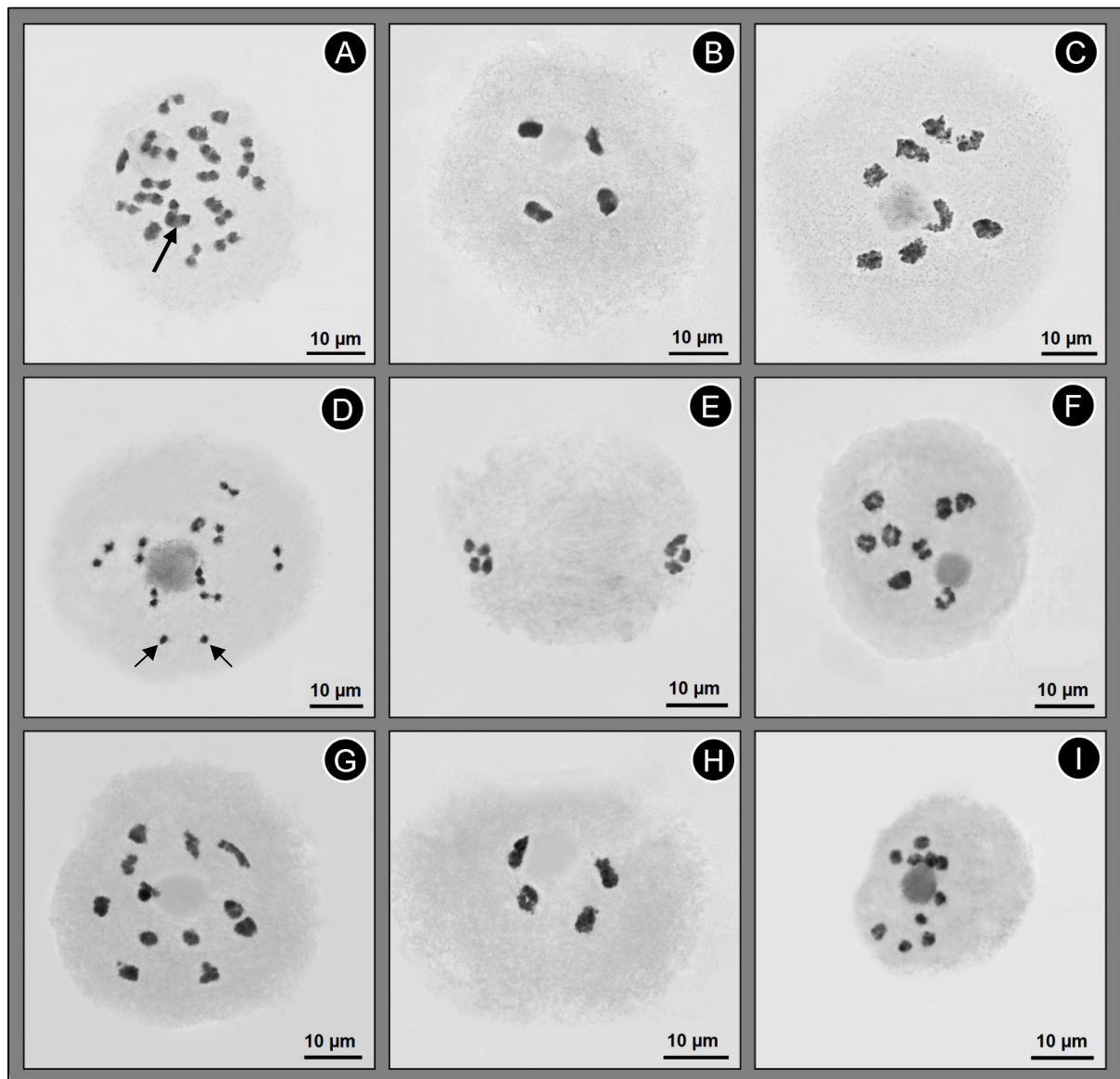


Figura 1. Células em meiose mostrando os cromossomos de espécies de Arthropogoninae e Paspalinae. **A.** *Arthropogon villosus*, RCO 2971, diacinese com 20 bivalentes (seta indica dois bivalentes sobrepostos). **B-C.** *Mesosetum bifarium* **B.** diploide ($2n = 8$), V 15933, diacinese com quatro bivalentes. **C.** tetraploide ($2n = 16$), AROR 391, diacinese com 8 bivalentes. **D.** *M. cayennense*, RCO 2848, diacinese com 9 bivalentes e dois univalentes (setas). **E.** *M. chlorostachyum*, RCO 3033, anáfase I, quatro cromossomos em cada polo. **F.** *M. compressum*, ASS 274, diacinese com oito bivalentes. **G.** *M. gibbosum*, AROR 408, diacinese com 12 bivalentes. **H.** *M. pappophorum*, V 15949, diacinese com quatro bivalentes. **I.** *Spheneria kegelii*, RCO 3007, diacinese com 10 bivalentes.

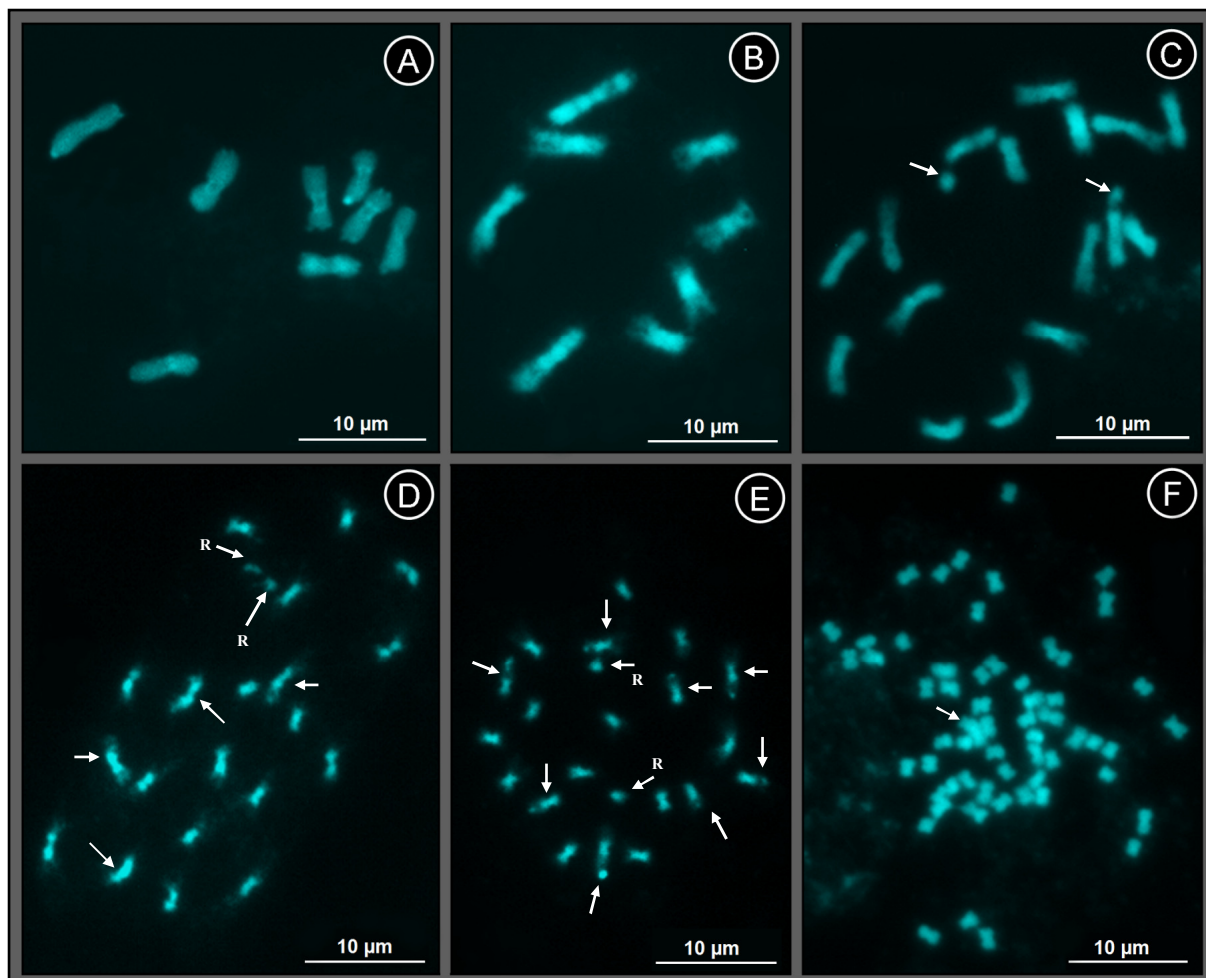


Figura 2. Células em mitose coradas com DAPI mostrando os cromossomos de espécies de Arthropogoninae. **A-C.** Espécies com número cromossômico básico $x = 4$. **A.** *Mesosetum ansatum* ($2n = 8$), RCO 2766. **B.** *M. bifarium* ($2n = 8$), V 15933. **C.** *M. compressum* ($2n = 16$), ASS 274, com região organizadora do nucléolo (RON) distendida e satélites evidentes (setas). **D-F.** Espécies com número cromossômico básico $x = 10$. **D.** *M. cayennense* ($2n = 20$), AROR 362, com RON distendida mostrando satélites isolados dos braços cromossômicos (setas R), mais quatro cromossomos satelitados (setas). **E.** *M. rottboellioides* ($2n = 20$), PAR 331, com RON distendida mostrando satélites maiores isolados (setas R) dos braços cromossômicos, mais oito cromossomos satelitados (setas). **F.** *Tatianyx arnacites*, ($2n = 60$), AROR 411, seta indicando dois cromossomos sobrepostos.

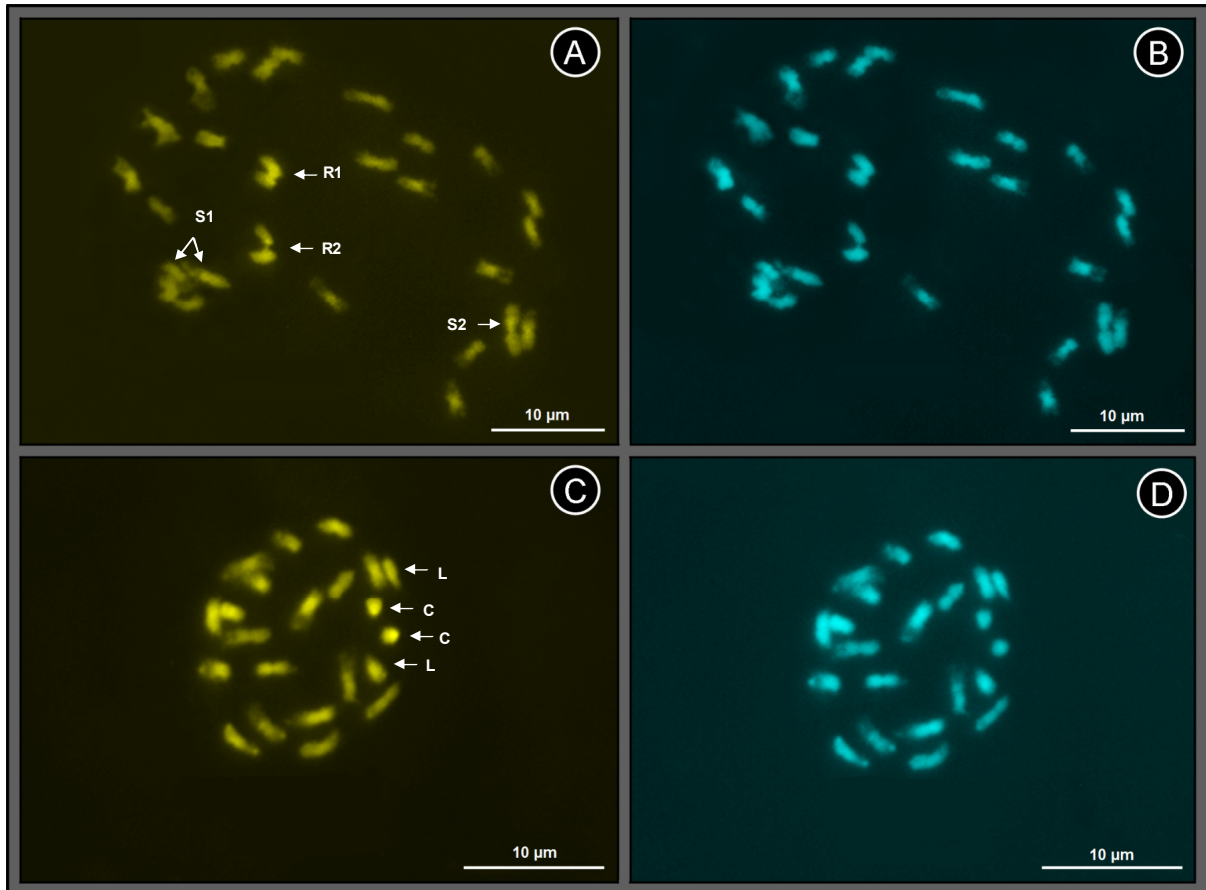


Figura 3. Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* com $x = 10$ e $x = 13$ coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul). **A-B.** *Mesosetum exaratum* ($2n = 26$), AROR 351, mostrando dois pares cromossômicos com instabilidade centromérica, o primeiro (R1 e R2) incluindo região organizadora do nucléolo (RON) e o segundo (S1 e S2) satelitado. **A.** Célula corada com CMA mostrando banda mais intensa localizada na RON situada na região centromérica (setas R1 e R2) levemente distendida em um dos cromossomos (R2); um dos cromossomos satelitados também está com o centrômero distendido (S1). **B.** Mesma célula corada com DAPI. **C-D.** *M. ferrugineum* var. *setaceum* ($2n = 20$), AROR 409, mostrando um par cromossômico com instabilidade centromérica. **C.** Célula corada com CMA mostrando banda intensa na RON localizada no fragmento proveniente do braço curto (C) e dois fragmentos provenientes do braço longo (L), sendo possível identificar mais pelo menos 10 cromossomos satelitados. **D.** Mesma célula corada com DAPI.

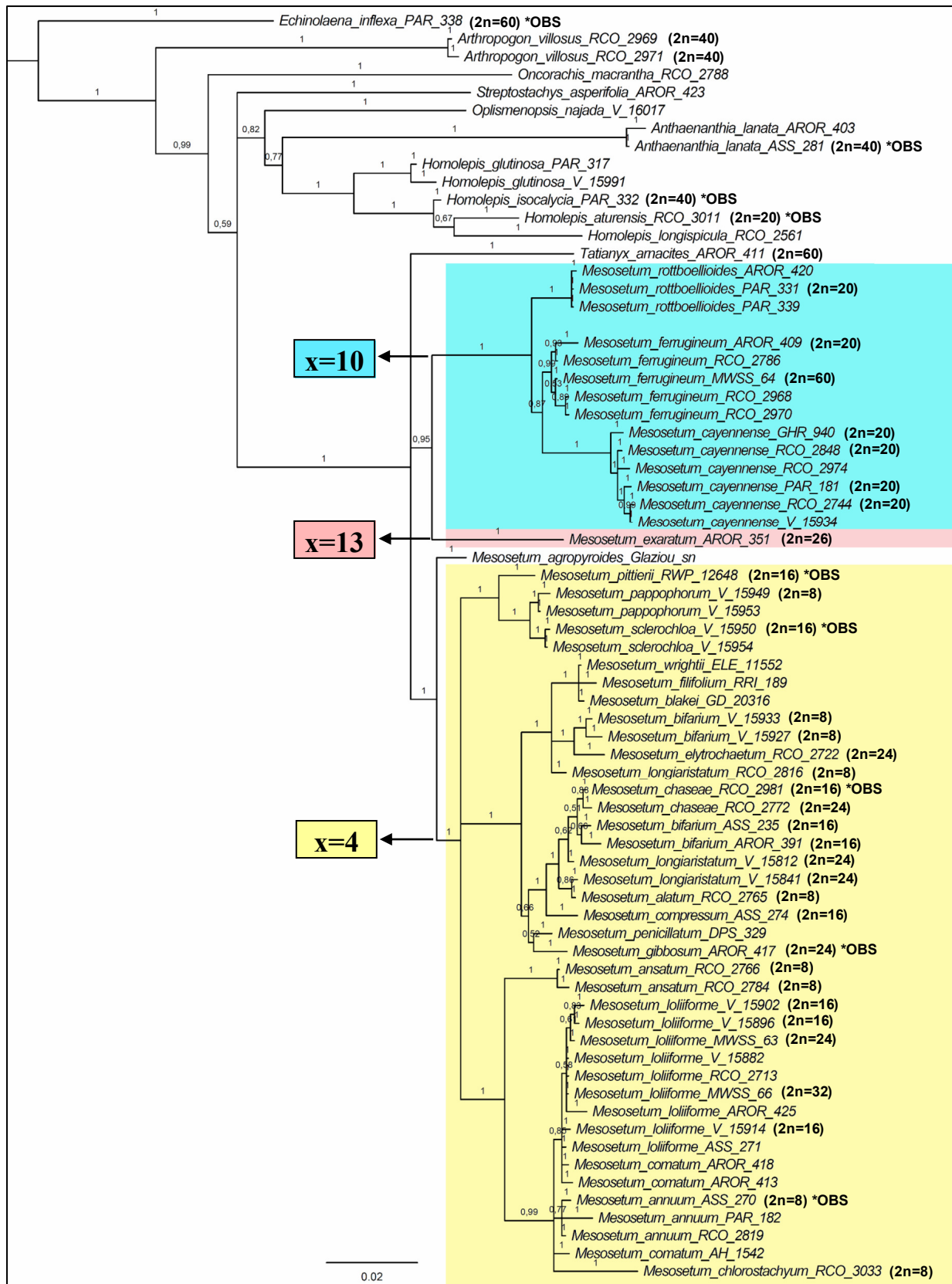


Figura 4. Dados de número cromossômico do presente trabalho enriquecidos por revisão de literatura e plotados na árvore filogenética das espécies de *Mesosetum* elaborada por Silva (dados não publicados) baseada em análise bayesiana combinada dos marcadores ITS, *trnL-F*, *psbA-trnH* e *matK*. *OBS: Número cromossômico encontrado para mesma espécie, porém em acesso diferente do utilizado na árvore filogenética.

Morfologia dos cromossomos em mitose

Os cromossomos mitóticos corados com DAPI mostraram bandas intensas nas regiões centroméricas e pericentroméricas de todas as espécies examinadas com $x = 4$, $x = 10$ e $x = 13$ (Figuras 2 e 3). Alguns cromossomos também mostraram bandas de DAPI terminais (Figuras 2 e 3). Todas as bandas DAPI centroméricas e terminais também coraram intensamente com CMA (Figura 3) indicando que a heterocromatina AT e GC repetitiva estão colocalizadas nestas regiões cromossômicas.

Já a região organizadora do nucléolo (RON) mostrou banda mais intensa somente com CMA (Figura 3) em *M. cayennense* ($2n = 20$), *M. compressum* ($2n = 16$), *M. exaratum* ($2n = 26$), *M. ferrugineum* var. *setaceum* ($2n = 20$) e *M. rottboellioides* ($2n = 20$) (Figuras 2 e 3). Em *M. ansatum* e *M. bifarium* não foi possível identificar a RON pela dupla coloração CMA-DAPI. Em *M. exaratum* e *M. ferrugineum* var. *setaceum* foram observados cromossomos com instabilidade centromérica (Figura 3).

Os cromossomos das espécies com $x = 10$ variaram entre 1,5-4,0 μm de comprimento e foram os menores entre todas as espécies (Tabela 3). Entre as espécies com $x = 10$, os menores cromossomos foram encontrados em *T. arnaces* com comprimento variando entre 1,5-2,5 μm . Entre as espécies de *Mesosetum*, os menores cromossomos foram encontrados em *M. rottboellioides* com comprimento variando entre 1,8-3,9 μm . Foram encontrados cromossomos satelitados em todas as espécies de *Mesosetum* com $x = 10$, sendo seis pares satelitados em *M. cayennense*, 10 pares satelitados em *M. ferrugineum* var. *setaceum*, e 10 pares satelitados em *M. rottboellioides*. A RON está localizada no maior satélite em *M. cayennense* e *M. rottboellioides*.

Tabela 3. Variação do tamanho cromossômico entre os cromossomos observados em metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* e *Tatianyx*

Espécie	Acesso	Número cromossômico	Comprimento cromossômico mínimo e máximo
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlm.	RCO 2766	2n = 8	5,1-6,8 µm
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15933	2n = 8	4,5-7,2 µm
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	AROR 362	2n = 20	2,3-4,0 µm
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	3,7-6,3 µm
<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>setaceum</i> Filg.	AROR 409	2n = 20	2,3-3,9 µm
<i>Mesosetum exaratum</i> (Trin.) Chase	AROR 351	2n = 26	2,5-5,0 µm
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331	2n = 20	1,8-3,9 µm
<i>Tatianyx arnacites</i> (Trin.) Zuloaga & Soderstr.	AROR 411	2n = 60	1,5-2,5 µm

Em *M. ferrugineum* var. *setaceum* foi observada instabilidade centromérica em apenas 1 par, que não possui satélite e no qual a RON está localizada. Quando a RON está distendida, também há rompimento do centrômero, formando dois fragmentos, um proveniente do braço longo e outro proveniente do braço curto, o qual mantém a banda intensa de CMA (Figura 3 C-D).

Os maiores cromossomos foram observados nas espécies com $x = 4$, com cromossomos variando entre 3,7 e 7,2 µm. Em *M. bifarium* foram encontrados os maiores cromossomos com comprimento variando entre 4,5 e 7,2 µm. Em *M. ansatum* foram observados pequenos satélites em todos os cromossomos. Em *M. compressum* foi observado apenas um par satelitado.

Os cromossomos de *M. exaratum* com $x = 13$ tiveram comprimento variando entre 2,5 e 5,0 µm e um par satelitado foi observado (Figura 3). Em *M. exaratum* foram observados dois pares com instabilidade centromérica, um deles contendo a RON, que quando está

distendida rompe o centrômero originando dois fragmentos. O outro par com instabilidade centromérica corresponde ao par satelitado (Figura 3A-B).

1.4 Discussão

O número cromossômico $2n = 26$ observado no presente trabalho em *M. exaratum* é pela primeira vez registrado na subfamília Panicoideae. A ocorrência do número cromossômico básico $x = 13$ é rara e citada somente para oito gêneros de Poaceae, dos quais seis pertencem à subfamília Pooideae, um a subfamília Aristidoideae e um a subfamília Chloridoideae (Tabela 4).

Tabela 4. Espécies de Poaceae com $2n = 26$ cromossomos de acordo com a base de dados de Goldblatt & Johnson (2016) e enriquecida com revisão de literatura da presente tese de doutorado

Espécie	Gam. (n)	Spor. (2n)	Subfamília*	Tribo*	Referência
<i>Calamagrostis sukatschewii</i> (Popl.) Roshev.		26	Pooideae	Poeae	Belaeva & Siplivinsky (1981)
<i>Chaetium bromoides</i> (J. Presl) Benth. ex Hemsl.		26	Aristidoideae	Aristidae	Pohl & Davidse (1971)
<i>Deschampsia antarctica</i> Desv.		26	Pooideae	Poeae	Cardone <i>et al.</i> (2009); Amosova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia argentea</i> (Lowe) Lowe		26	Pooideae	Poeae	Dalgaard (1991)
<i>Deschampsia baicalensis</i> Tzvelev		26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia borealis</i> (Trautv.) Roshev.		26	Pooideae	Poeae	Zhukova & Petrovsky (1980); Petrovsky & Zhukova (1981); Zhukova (1982)
<i>Deschampsia bottnica</i> (Wahlenb.) Trin.		26	Pooideae	Poeae	Albers (1980)
<i>Deschampsia caespitosa</i> (L.) P. Beauv.		26	Pooideae	Poeae	Pashuk (1980); Stoeva (1982); Beuzenberg & Hair (1983); Strid & Franzen (1983)

<i>Deschampsia chapmanii</i> Petrie	26	Pooideae	Poeae	Murray <i>et al.</i> (2005)
<i>Deschampsia flexuosa</i> (L.) Trin.	26	Pooideae	Poeae	Druskovic & Lovka (1995)
<i>Deschampsia gracillima</i> Kirk	26	Pooideae	Poeae	Murray <i>et al.</i> (2005)
<i>Deschampsia komarovii</i> V.N. Vassil.	26	Pooideae	Poeae	Zhukova (1980); Petrovsky & Zhukova (1981); Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia macrothyrsa</i> (Tatew. & Ohwi) Kawano	26	Pooideae	Poeae	Probatova (1984); Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia media</i> (Gouan) Roem. & Schult.	26	Pooideae	Poeae	Kerguelen (1975); Albers (1980); Garcíá-Suárez <i>et al.</i> (1997)
<i>Deschampsia obensis</i> Roshev.	26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia pamirica</i> Roshev.	26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia paramushirensis</i> Honda	26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia refracta</i> (Lagasca) Roem. & Schult.	26	Pooideae	Poeae	Albers (1980)
<i>Deschampsia submutica</i> (Trautv.) O.D. Nikif.	26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia sukatschewii</i> (Popl.) Roshev.	26	Pooideae	Poeae	Probatova <i>et al.</i> (2015)
<i>Deschampsia tenella</i> Petrie	26	Pooideae	Poeae	Murray <i>et al.</i> (2005)
<i>Deschampsia tzvelevii</i> Prob.	26	Pooideae	Poeae	Probatova (1984); Probatova (2004); Probatova (2005)
<i>Deschampsia wibeliana</i> (Sond. ex Koch) Parl.	26	Pooideae	Poeae	Měsíček (1992)
<i>Hainardia cylindrica</i> (Willd.) Greuter	13	Pooideae	Poeae	Devesa <i>et al.</i> (1990); Cuccuini & Fiurini (2004)
<i>Lophochloa phleoides</i> (Vill.) Rchb.	26	Pooideae	Poeae	Ko 3zuharov & Petrova (1991)
<i>Lophochloa pumila</i> (Desf.) Bor	13	Pooideae	Poeae	Devesa & Zarco (1984)

<i>Nardus stricta</i> L.	26	Pooideae	Nardeae	Arohonka (1982); Kožuharov & Petrova (1991); Krahulcová (2003)
<i>Orcuttia tenuis</i> Hitche.	26	Chloridoideae	Cynodonteae	Reeder (1982)
<i>Rostraria cristata</i> (L.) Tzvelev	13	Pooideae	Poeae	Devesa <i>et al.</i> (1991)

Gam.: número cromossômico observado em gametófito. **Espor.:** número cromossômico observado em esporófito. * As subfamílias e tribos estão de acordo com base de dados de USDA & ARS (2016).

Em Arthropogoninae, as contagens obtidas pelo presente trabalho de $2n = 40$ em *Arthropogon villosus* e $2n = 60$ em *Tatianyx arnatices* (também citado por Morrone *et al.* 1995) aliadas aos registros de $2n = 20$ em *Homolepis aturensis*, $2n = 40$ em *H. isocalycia* e $2n = 40$ em *Phanopyrum gymnocarpon* (Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971; Kessler & Hatch 1984) suportam $x = 10$ como número cromossômico básico da subtribo e corroboram os dados da filogenia proposta por Morrone *et al.* (2012) que atribuíram $x = 10$ como número cromossômico básico da tribo Paspaleae.

Em *Mesosetum*, os números cromossômicos reportados pelo presente trabalho reforçam os resultados obtidos por Ribeiro (2013), Sousa (2014), Ribeiro *et al.* (2015) e suportam os dois clados propostos pela filogenia de Silva (dados não publicados), um com $x = 10$ representado por três espécies, o outro com $x = 4$ representado por 20 espécies, 14 das quais com número cromossômico conhecido. O número cromossômico básico $x = 13$ também suporta a linhagem monoespecífica de *M. exaratum* na filogenia proposta por Silva (dados não publicados) e não foi observado em nenhuma outra espécie de *Mesosetum*. A linhagem monoespecífica de *M. agropyroides* permanece com número cromossômico desconhecido.

O clado com número cromossômico básico $x = 10$ ($2n = 20$ e $2n = 60$) é provavelmente o mais basal em *Mesosetum* (Silva dados não publicados) e também o mais relacionado citologicamente aos gêneros irmãos pertencentes à subtribo Arthropogoninae e tribo Paspaleae, os quais também possuem números cromossômicos múltiplos de $x = 10$. Este

clado provavelmente conserva um cariótipo mais próximo ao ancestral de *Mesosetum* e ao ancestral da subfamília Panicoideae cuja maioria dos registros de números cromossômicos é de $2n = 20$ ($x = 10$) com cromossomos pequenos entre 1,0 e 4,5 μm e genoma de tamanho reduzido com valor modal de quantidade de DNA por cromossomo ($2C/2n$) igual a 0,1 pg (Morrone *et al.* 1995; Price *et al.* 2005; Morrone *et al.* 2006; Hidalgo *et al.* 2007; Sede *et al.* 2010; Leitch *et al.* 2010; Pozzobon *et al.* 2013; Bernardo Filho *et al.* 2014).

Em *Mesosetum*, o clado $x = 10$ é representado pelas espécies *M. cayennense* ($2n = 20$), a espécie tipo do gênero, *M. ferrugineum* ($2n = 20$ e $2n = 60$) e *M. rottboelioides* ($2n = 20$). Essas espécies foram tratadas como *Mesosetum* sect. *Fulva* por Swallen (1937), a qual foi aceita, mas renomeada como *Mesosetum* sect. *Mesosetum* por Filgueiras (1986, 1989), por conter a espécie tipo. O tamanho reduzido dos cromossomos entre 1,8 e 4,0 μm é uma característica compartilhada pelas espécies do clado $x = 10$, intervalo o qual está inserido dentro do tamanho cromossômico da maioria das espécies de Panicoideae (Morrone *et al.* 1995; Price *et al.* 2005; Morrone *et al.* 2006; Sede *et al.* 2010; Leitch *et al.* 2010; Bernardo Filho *et al.* 2014). Além disso, a presença de pelos ferrugíneos nas glumas e antécio inferior são características compartilhadas pelas espécies de *Mesosetum* com $x = 10$ (Filgueiras 1986, 1989; Sousa 2014; Silva *et al.* 2015; Silva dados não publicados).

O citótipo diploide ($2n = 20$) encontrado em *M. ferrugineum* var. *setaceum* evidencia pela primeira vez a ocorrência de poliploidia dentro da espécie *M. ferrugineum* e também do clado $x = 10$ em *Mesosetum*. O número cromossômico $2n = 60$ já havia sido reportado para *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* (Sousa 2014), que, portanto, é um hexaploide natural. Entretanto, ainda não foi possível a observação da meiose nesta espécie para comparar como se comporta o pareamento dos cromossomos no diploide ($2n = 20$) e no hexaploide ($2n = 60$). A dificuldade de obtenção de inflorescências jovens é o principal entrave ao desenvolvimento de estudos meióticos nesta espécie. O florescimento de *M. ferrugineum* é abrupto e somente

ocorre após incêndios em seu habitat natural e ainda não houve sucesso na indução do florescimento em suas mudas cultivadas na casa de vegetação.

O segundo clado de *Mesosetum* possui número cromossômico básico $x = 4$ (Ribeiro 2013, Sousa 2014, Ribeiro *et al.* 2015), o qual não é reportado para nenhum outro gênero de Arthropogoninae. Neste clado, o número cromossômico básico já foi comprovado em 14 espécies, incluindo representantes de *Mesosetum* sect. *Bifaria*, *M.* sect. *Loliiformia* Swallen e *M.* sect. *Sclerochloae* Swallen (Filgueiras 1986, 1989). O clado $x = 4$ possui cromossomos com tamanho de 3,7-7,2 μm , os quais chegam a ser até três vezes maiores que os cromossomos das espécies do clado com $x = 10$ (Tabela 3, Figura 2). Não obstante, o clado $x = 4$ apresenta série poliploide até o nível octaploide com registros de $2n = 8, 16, 24$ e 32 cromossomos. Quanto à morfologia das espiguetas, o clado $x = 4$ é bastante polimórfico, incluindo espécies com glumas múticas a aristadas, planas a conduplicadas, glabras ou pilosas, com pelos alvos ou vináceos.

A ausência de registros dos números cromossômicos $2n = 8, 16, 24$ ou 32 em outros gêneros da subtribo Arthropogoninae torna mais plausível a hipótese de que $x = 4$ surgiu dentro do gênero *Mesosetum*. O cariótipo com $x = 4$ provavelmente surgiu por fusão, rearranjos ou perda de cromossomos a partir de espécies com número cromossômico básico $x = 10$, que é provavelmente mais basal em *Mesosetum* (Silva dados não publicados).

A origem de $x = 4$ a partir de $x = 10$ corresponde a maior redução do número cromossômico já registrada na tribo Paspaleae. Uma redução drástica e abrupta do genoma por perda de cromossomos seria deletéria, pois afetaria mais da metade dos genes e codificação de proteínas. Tal fato torna mais provável a hipótese que $x = 4$ surgiu em *Mesosetum* por fusão ou rearranjos cromossômicos em eventos graduais com possível ocorrência de números cromossômicos intermediários entre $x = 10$ e $x = 4$.

Estudos citológicos em *M. agropyroides* Mez, podem esclarecer a origem do número cromossômico básico $x=4$ e devem ser estimulados. O número cromossômico de *M. agropyroides* ainda é desconhecido e na filogenia de *Mesosetum* esta espécie forma um ramo mais basal e estritamente relacionado ao clado com $x=4$ (Silva dados não publicados). As tentativas de coleta de *M. agropyroides* na sua localidade típica e em novas ocorrências foram inexitosas e dificultadas pelo fato do florescimento desta espécie estar relacionado ao estímulo pelo fogo (Filgueiras 1986, 1989; Silva *et al.* 2016).

O número cromossômico básico $x = 13$ aqui encontrado em *M. exaratum* ainda não foi observado em nenhuma outra espécie de *Mesosetum*, o que dificulta discutir sobre sua origem e evolução. O gênero *Deschampsia* P. Beauv., subfamília Pooideae, possui o maior número de espécies com $2n = 26$ cromossomos (Tabela 4). Neste gênero, a origem do número cromossômico básico $x = 13$ é atribuída a uma redução a partir do número básico secundário $x = 14$, que por sua vez originou-se por poliploidia a partir de $x = 7$ (Cardone *et al.* 2009; Amosova *et al.* 2015).

Em *M. exaratum* a origem de $x = 13$ parece ser distinta. De acordo com a filogenia de *Mesosetum* baseada em caracteres moleculares (Silva dados não publicados), *M. exaratum* está mais estritamente relacionada com as espécies do clado $x = 10$. O número cromossômico básico $x = 13$ encontrado em *M. exaratum* provavelmente derivou-se de $x = 10$ por fissão ou duplicação de cromossomos. A presença de dois pares com instabilidade do centrômero em *M. exaratum* pode ser indício desta tendência de aumento do número cromossômico por fissão centromérica, a qual originou $x = 13$.

Em *M. ferrugineum* ($2n = 20$) também foi encontrado um par com instabilidade centromérica. Este aspecto induz a contagem de 22 cromossomos, porém o exame de algumas células mostra fusos de cromatina ligando os dois fragmentos comprovando que o número cromossômico é realmente $2n = 20$. A observação de instabilidade centromérica também em

espécies com $x = 10$ reforça a hipótese de que $x = 13$ surgiu por aumento do número cromossômico desencadeado por fissão centromérica, sugerindo que os números cromossômicos $x = 11$ e $x = 12$ também podem ter participado da evolução cromossômica de *Mesosetum*.

1.5 Conclusão

As espécies do clado $x = 10$ são provavelmente as mais basais de *Mesosetum* e compartilham o mesmo número cromossômico dos gêneros irmãos pertencentes a subtribo Arthropogoninae. Dentro de *Mesosetum* a evolução por meio de mudanças em ordem cromossômica originou pelo menos três linhagens correspondentes aos números básicos $x = 4$, $x = 10$ e $x = 13$.

O clado $x = 10$ provavelmente manteve o conjunto cromossômico mais conservado e semelhante ao ancestral. O clado $x = 4$ e a linhagem com $x = 13$, derivados a partir de $x = 10$, seguiram rotas de evolução cromossômica divergentes, a primeira ($x = 4$) por redução e a segunda ($x = 13$) por aumento.

A ampliação dos estudos envolvendo contagens cromossômicas e caracterização citogenética avançada deve ser estimulada para elucidar a origem dos números cromossômicos raros, $x = 4$ e $x = 13$, encontrados em *Mesosetum*. A caracterização citogenética de outros gêneros e espécies de Arthropogoninae e Paspaleae também deve ser conduzida, tendo em vista que auxiliará e complementará o conhecimento acerca da evolução cromossômica em *Mesosetum*.

1.6 Referências

Albers F (1980) Comparative karyology of the grass subtribes Aristaveninae and Airinae (Poaceae-Avenae). *Plant Systematics and Evolution* 136: 137-167

- Amosova AV, Bolsheva NL, Samatadze TE, Twardovska MO, Zoshchuk SA, Andreev IO, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. PLoS ONE 10(9): 1-17
- Arohonka T (1982) Chromosome counts of vascular plants of the island Seili in Nauvo, southwestern Finland. Turun Yliopiston Julkaisuja, Sar. A 2 Biology Geography 3: 1-12
- Belaeva VA, Siplivinsky V (1981) Chromosome number reports LXXIII. Taxon 30: 857–860
- Bernardo Filho RA, Santos AC, Souza FH, Valls JFM, Pagliarini MS (2014) Complete asynapsis resulting in 2n pollen formation in *Paspalum jesuiticum* Parodi (Poaceae). Genetics and Molecular Research 13(1): 255-261
- Beuzenberg EJ, Hair JB (1983) Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora - 25 miscellaneous species. New Zealand Journal of Botany. 21: 13-20
- Burke SV, Wysocki WP, Zuloaga FO, Craine JM, Pires JC, Edger PP, Mayfield-Jones D, Clark LG, Kelchner SA, Duvall MR (2016) Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (Panicoideae; Poaceae). BMC Plant Biology 16(140): 1-11
- Cardone S, Sawatani P, Rush P, García AM, Poggio L, Schrauf G (2009) Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). Polar Biology 32: 427-433
- Celariet R, Paliwal R (1957) Basic chromosome number of four in the subfamily Panicoideae of the Gramineae. Science 126: 1247
- Cuccuini P, Fiorini G (2004) Genere Hainardia Grueter (Poaceae) in Italia. Note tassonomiche, citologiche ed ecologiche. . Webbia 59(1): 149-175
- Dalgaard V (1991) Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia II. Willdenowia 20: 139-152

- Davidse G, Pohl RW (1972) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and the West Indies. *Canadian Journal of Botany* 50: 1441-1452
- De Wet JMJ (1987) Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass systematics and evolution*, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, pp 188-194
- Devesa JA, Zarco CR (1984) Números cromosómicos para la flora española *Lagascalia* 12: 290-292
- Devesa JA, Ruiz T, Tormo R, Muñoz A, Viera MC, Carrasco J, Ortega A, Pastor J (1990) Contribución al conocimiento citológico de las Poaceae en Extremadura II. *Boletim da Sociedade Broteriana* 63: 153-205
- Devesa JA, Ruiz T, Viera MC, Tormo R, F. Vázquez, Carrasco JP, Ortega A, Pastor J (1991) Contribución al conocimiento citológico de las Poaceae en Extremadura (España)— III., sér. 2 *Boletim da Sociedade Broteriana* 64: 35-74
- Druskovic B, Lovka M (1995) IOPB chromosome data 9 *International Organization of Plant Biosystematists* 24: 15-19
- Filgueiras TS (1986) O gênero *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil
- Filgueiras TS (1989) Revisão de *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). *Acta Amazônica* 19: 47-114
- Filgueiras TS, Silva AS, Oliveira RC (2016) *Mesosetum* In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13355>, Accessed 18 Jan. 2016
- García-Suárez R, Alonso-Blanco C, Fernández-Carvajal MC, Fernández Prieto JA, Roca A, Giraldez R (1997) Diversity and systematics of *Deschampsia* sensu lato (Poaceae)

- inferred from karyotypes, protein electrophoresis, total genomic DNA hybridization and chloroplast DNA analysis. *Plant Systematics and Evolution* 205: 99-110
- Goldblatt P, Johnson DE (2016) Index to plant chromosome numbers 1979-onwards. Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA. Available at: <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>, Accessed 23 Nov. 2016
- Gould FW (1966) Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Canadian Journal of Botany* 44: 1683-1696
- Gould FW, Soderstrom TR (1967) Chromosome numbers of tropical American grasses. *American Journal of Botany* 54: 676-683
- Group GGPW (2001) Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88(3): 373-457
- Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP
- Hidalgo MIM, Caponio I, Norman GA (2007) Citogenética y biología reproductiva de *Anthaenantia lanata* (Kunth) Benth. (Poaceae: Panicoideae). *Kurtziana* 33(2): 27-33
- Hilu K (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52: 13-22
- Kerguelen M (1975) Les Gramineae (Poaceae) de la flore Francaise essai de mise au point taxonomique et nomenclaturale. *Lejeunia* 75: 1-343
- Kessler JW, Hatch SL (1984) Chromosome Number Reports LXXXII. *Taxon* 33: 126-134
- Kořuharov SI, Petrova AV (1991) Chromosome numbers of Bulgarian angiosperms. *Fitologija* 39: 72-77
- Krahulcová A (2003) Chromosome numbers in selected monocotyledons (Czech Republic, Hungary, and Slovakia) *Preslia* 75: 97-113

- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome Size Dynamics and Evolution in Monocots. *Journal of Botany* 862516: 1-18
- Měsíček J (1992) List of Chromosome Numbers of the Czech Vascular Plants. Academia, Praha:
- Morrone O, Hunziker JH, Zuloaga FO, Escobar A (1995) Números cromosómicos en Paniceae sudamericanas (Poaceae: Panicoideae). *Darwiniana* 3(1-4): 53-60
- Morrone O, Escobar A, Zuloaga FO (2006) Chromosome studies in American Panicoideae (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 647-657
- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA, Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Sede SM, Giussani LM, Kellogg EA, Zuloaga FO (2012) Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28: 333-356
- Murat F, Xu J-H, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research* 20: 1545-1557
- Murray BG, Lange PJ, Ferguson AR (2005) Nuclear DNA variation, chromosome numbers and polyploidy in the endemic and indigenous grass flora of New Zealand. *Annals of Botany* 96: 1293-1305
- Pashuk HT (1980) Comparative cytogenetic investigation of *Deschampsia caespitosa* and *Anthoxanthum alpinum* in the primary and secondary communities. *Citol. Genet.* 14(4): 47-53
- Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9903-9908

- Petrovsky VV, Zhukova PG (1981) Chromosome numbers and taxonomy of some plant species of Wrangel Island. *Botanicheskii Zhurnal* 66(3): 380–387
- Pohl RW, Davidse G (1971) Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia* 23: 293-324
- Pozzobon MT, Valls JFM (1997) Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 29-34
- Pozzobon MT, Paganella MB, Santos S, Valls JFM (2013) Cytological and reproductive aspects in the Caespitosa group of *Paspalum*. *Ciência Rural* 43 (11): 2004-2010
- Price HJ, Dillon SL, Hodnett G, Rooney WL, Ross L, Johnston JS (2005) Genome Evolution in the Genus *Sorghum* (Poaceae). *Annals of Botany* 95: 219-227
- Probatova NS (2004) Chromosome numbers of selected vascular plant species from Sakhalin, Moneron and the Kurile Islands. *Biodiversity and biogeography of the Kuril Islands Sakhalin 1*: 15-23
- Probatova NS (2005) A progress in the study of the chromosome numbers of rare and endemic species of the flora of the Russian Far East. *Karyology, Karyosystematics and Molecular Phylogeny*: 85–86
- Probatova NS (1984) New taxa of the Poaceae from the Far East of the USSR. *Botanicheskii Zhurnal* 69(2): 251-259
- Probatova NS, Seledets VP, Barkalov VY (2015) Chromosome numbers in some species of Poaceae from Russia. *Botanica Pacifica* 4(1):
- Rao Y (1975) Evolutionary trends in the Indian Iseilema. *Nature* 255: 220-221
- Reeder JR (1982) Systematics of the tribe Orcuttieae (Gramineae) and the description of a new segregate genus, *Tuctoria*. . *American Journal of Botany* 69(7): 1082-1095

- Ribeiro ARO (2013) Citogenética, reprodução e variabilidade morfológica de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase (Poaceae: Paniceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Ribeiro ARO, Sousa MWS, Oliveira RC, Araujo ACG, Fagg CW, Pozzobon MT (2015) Cytological studies in four species of *Mesosetum* (Arthropogoninae) reveal the lowest chromosome number among the Neotropical Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301(10): 2377-2386
- Sede S, Escobar A, Morrone O, Zuloaga FO (2010) Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae-Panicoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 128-138
- Silva AS, Ribeiro ARO, Sousa MWS, Fagg CW, Falcão R, Oliveira RC (2015) Micromorphology of the upper antheridium in *Mesosetum* Steud. and related genera (Poaceae, Arthropogoninae) and its taxonomic applications. *Rodriguésia* 66(2): 645-657
- Silva AS (dados não publicados) Filogenia de *Mesosetum* Steud. (Paspaleae: Poaceae) com base caracteres moleculares. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Silva LAC, Pagliarini MS, Santos SA, Silva N, Souza VF (2012) Chromosome number, microsporogenesis, microgametogenesis, and pollen viability in the Brazilian native grass *Mesosetum chaseae* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4100-4109
- Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Zuloaga FO, Judziewicz EJ, Filgueiras TS, Davis JJ, Morrone O (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *Journal of Systematics and Evolution* 53(2): 117–137
- Sousa MWS (2014) Citogenética e morfologia de espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae, Paspaleae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 111-116
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M (2012) Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* 109: 987-999
- Stoeva MP (1982) IOPB chromosome number reports LXXVI. *Taxon* 31: 579–580
- Strid A, Franzen R (1983) Chromosome numbers in flowering plants from Greece. *Willdenowia* 13: 329–333
- Studer AJ, Schnable JC, Weissmann S, Kolbe AR, McKain MR, Shao Y, Cousins AB, Kellogg EA, Brutnell TP (2016) The draft genome of the C3 panicoid grass species *Dichanthelium oligosanthes*. *Genome Biology* 17(223): 1-18
- Swallen JR (1937) The grass genus *Mesosetum*. *Brittonia* 2(4): 363-392
- Thiers B (2016) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>, Accessed 02 Feb. 2016
- USDA, ARS [National Genetic Resources Program] (2016) Germplasm Resources Information Network - GRIN (Online Database). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Available at: <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomylist.aspx?category=genera&type=family&value=Poaceae&id=897>, Accessed 03 Nov. 2016
- Wang X, Wang J, Jin D, Guo H, Lee T-H, Liu T, Paterson AH (2015) Genome Alignment Spanning Major Poaceae Lineages Reveals Heterogeneous Evolutionary Rates and Alters Inferred Dates for Key Evolutionary Events. *Molecular Plant* 8: 885-898

- Zhao Y, Tang L, Li Z, Jin J, Luo J, Gao G (2015) Identification and analysis of unitary loss of longestablished protein-coding genes in Poaceae shows evidences for biased gene loss and putatively functional transcription of relics. *BMC Evolutionary Biology* 15(66): 2-10
- Zhukova PG, Petrovsky VV (1980) Chromosome numbers and taxonomy of some species of the Anyui Mts. *Botanicheskii Zhurnal* 65(5): 651-659
- Zhukova PG (1980) Chromosome numbers of some Southern Chukotka plant species. *Botanicheskii Zhurnal* 65 (1): 51–59
- Zhukova PG (1982) Chromosome numbers of some plant species of north-eastern Asia. *Botanicheskii Zhurnal* 67(3): 360–365

CAPÍTULO 2

Estudos de citometria de fluxo e tamanho do genoma em espécies de *Mesosetum* Steud.

(Poaceae: Paspaleae) e outros gêneros de Arthropogoninae

2.1 Introdução

A variação do número cromossômico aliada aos processos de poliploidia, hibridação e diploidização foram determinantes na evolução do genoma das espécies de Poaceae (De Wet 1987; Hilu 2004; Shapova *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015; Studer *et al.* 2016). Entre estes processos, a autopoliploidia e a alopoliploidia foram os eventos que mais contribuíram ao aumento do tamanho do genoma em todas as principais linhagens de Poaceae (Hunziker & Stebbins 1987; Schnable *et al.* 2012).

Enquanto mudanças estruturais dos nucleotídeos propiciaram a neofuncionalização ou subfuncionalização de genes, a multiplicação de todo complemento cromossômico básico forneceu cópias extras de genes essenciais à sobrevivência, possibilitando oportunidades de inovação genética (Hunziker & Stebbins 1987; Wang *et al.* 2015; Studer *et al.* 2016).

O aumento do genoma desencadeado pela poliploidia foi seguido por uma recíproca perda de cópias redundantes de genes principalmente por fracionamento durante a irradiação de novas espécies (Langham *et al.* 2004; Paterson *et al.* 2004; Schnable *et al.* 2012). Embora ainda seja pouco compreendido, este processo de perda de genes que ocorreu paralelo à diploidização constitui-se na causa mais importante dos subseqüentes eventos de redução do genoma nas espécies de Poaceae (Murat *et al.* 2010, Schnable *et al.* 2012).

Na subfamília Panicoideae, o incremento por poliploidização seguido por redução mediante perdas de seqüências de DNA também se processou repetidas vezes no genoma de suas espécies (Langham *et al.* 2004; Price *et al.* 2005; Leitch *et al.* 2010; Schnable *et al.* 2012; Wang *et al.* 2015). Estes eventos de expansão e regressão do tamanho do genoma estão estritamente relacionados com a evolução cromossômica de Panicoideae, a qual apresenta predomínio dos números cromossômicos básicos $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$ em suas espécies (Hilu 2004; Price *et al.* 2005; Morrone *et al.* 2006; Sede *et al.* 2010; Murat *et al.* 2010; Pozzobon *et al.* 2013; Burke *et al.* 2016).

O cariótipo ancestral de Panicoideae provavelmente possuía número cromossômico básico $x = 11$, observado no monotípico basal *Gynerium sagittatum* (Aubl.) P. Beauv. O número cromossômico básico $x = 11$ foi perdido na maioria dos gêneros de Panicoideae, os quais possuem predomínio do número cromossômico básico $x = 10$ em suas espécies mais basais (Hilu 2004; Price *et al.* 2005; Murat *et al.* 2010, Burke *et al.* 2016). O cariótipo de vários gêneros de Panicoideae, além do número cromossômico básico $x = 10$, possui tamanho cromossômico e genomas pequenos com valor modal de quantidade de DNA por cromossomo ($2C/2n$) igual a 0,1 pg (Leitch *et al.* 2010). Estas características foram conservadas em algumas espécies ou se derivaram originando cromossomos e genomas maiores, tanto múltiplos de $x = 10$, como de outros números básicos (Price *et al.* 2005; Leitch *et al.* 2010; Vaio *et al.* 2007; Galdeano *et al.* 2016).

Além dos números cromossômicos básicos mais comuns $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$, as espécies de Panicoideae possuem registros de números cromossômicos pouco usuais como $x = 4$ (Celarier & Paliwal 1957; Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). A origem de $x = 4$ em Panicoideae ainda é pouco compreendida, sendo registrada somente nos gêneros *Iseilema* Andersson (Tribo Andropogoneae) e *Mesosetum* Steud. (Tribo Paspaleae). Entre as gramíneas neotropicais, *Mesosetum* é o único gênero com registro do número cromossômico $2n = 8$ ($x = 4$), o qual também é o menor número cromossômico já registrado entre as Poaceae dos neotrópicos.

O gênero *Mesosetum* foi posicionado na tribo Paspaleae, subtribo Arthropogoninae na última filogenia da tribo Paniceae *s.l.* (Morrone *et al.* 2012). A tribo Paspaleae engloba espécies americanas que compõe um clado com número cromossômico básico $x = 10$. A subtribo Arthropogoninae é composta por gêneros heterogêneos do ponto de vista morfológico, no qual *Mesosetum* destaca-se por ter o maior número de espécies. Dentro de

Arthropogoninae, *Mesosetum* compõe um clado altamente suportado com os gêneros *Keratochlaena* Morrone e *Tatianyx* Zuloaga & Soderstr. (Morrone *et al.* 2012).

O gênero *Mesosetum* possui 25 espécies e tem distribuição geográfica neotropical desde o sul do México até o nordeste da Argentina (Swallen 1937; Filgueiras 1986, 1989; Filgueiras *et al.* 2016). O Brasil é o centro de diversidade do gênero com ocorrência de 22 espécies, 16 das quais no bioma cerrado (Filgueiras *et al.* 2016; Silva *et al.* 2016).

Estudos moleculares em andamento (Silva dados não publicados), incluindo 24 espécies de *Mesosetum* mostraram que o gênero pode ser subdividido em pelo menos três linhagens correspondentes aos números cromossômicos básicos $x = 10$, $x = 13$ e $x = 4$ (Capítulo 1 desta tese). O clado com número cromossômico básico $x = 10$ é provavelmente o mais basal e conecta *Mesosetum* com os gêneros irmãos em Arthropogoninae. O clado $x = 4$ provavelmente derivou-se de $x=10$ por redução do número cromossômico, enquanto a linhagem monoespecífica de *M. exaratum* (Trin.) Chase com $x = 13$ derivou-se por aumento.

A variação dos números cromossômicos em série múltipla com $2n = 20$ e $2n = 60$ para o clado $x = 10$, bem como $2n = 8$, $2n = 16$, $2n = 24$ e $2n = 32$ para o clado $x = 4$ comprova a ocorrência de poliploidia durante a evolução das espécies de *Mesosetum* (Capítulo 1 desta tese de doutorado; Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). A poliploidia em *Mesosetum* também é comprovada pela ocorrência de associações múltiplas em trivalentes e quadrivalentes na meiose das espécies com $2n = 16$ e $2n = 24$ cromossomos (Ribeiro 2013).

Além da poliploidia, os rearranjos cromossômicos provavelmente também ocorreram durante a evolução das espécies de *Mesosetum*. Eventos de fusão, translocação ou perda de cromossomos estão implícitos na origem do clado com $x = 4$ a partir de $x = 10$. Já a origem de $x = 13$ a partir de $x = 10$ provavelmente pode estar associada a eventos de fissão ou duplicações de cromossomos (Capítulo 1 desta tese de doutorado).

Entretanto, estudos acerca do tamanho do genoma e quantidade de DNA são escassos em Panicoideae e inexistentes na subtribo Arthropogoninae, o que impossibilita avaliar como os eventos de poliploidia ou redução do número cromossômico interferiram na evolução do genoma de suas espécies.

O objetivo do presente capítulo foi estimar o tamanho do genoma de espécies de Arthropogoninae, com enfoque especial no gênero *Mesosetum* por meio de ensaios de citometria de fluxo, visando fornecer parâmetros acerca da evolução de suas espécies.

2.2 Material e Métodos

Foram realizadas expedições para diferentes regiões do Brasil com o objetivo de obter as plantas vivas para estudo. As expedições foram planejadas com base nos dados da revisão de herbários nacionais e internacionais B, BAA, BM, CAY, CEN, CPAP, ESA, F, G, HB, HEPH, HRB, HUEFS, HUTO, IAN, IBGE, ICN, IPA, K, LE, MG, MHS, MO, MOSS, NX, P, PAMG, R, RB, S, SP, SP, UB, UEC, UFMT, UFRN, US e VEN (acrônimos disponíveis em Thiers 2016), além da base de dados do SpeciesLink (2016) para determinação tanto dos locais quanto das épocas de florescimento das espécies.

Foram realizadas coletas no Distrito Federal e estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pernambuco e Tocantins, entre janeiro de 2013 a fevereiro de 2016. As mudas foram obtidas de touceiras, cultivadas na casa de vegetação da Universidade de Brasília e os *vouchers* depositados no herbário UB.

As plantas de 19 acessos, incluindo uma espécie de *Arthropogon* Nees, 13 espécies de *Mesosetum* e uma espécie de *Tatianyx* (Tabela 1) foram propagadas vegetativamente por meio de estolhos e fragmentação da touceira. Os propágulos foram implantados e cultivados ainda na casa de vegetação do Laboratório de Citogenética Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, junto com as mudas das espécies padrão.

Tabela 1. Discriminação da espécies de *Mesosetum* e outros gêneros de Arthropogoninae com respectivos acessos e locais de coleta utilizados nas análises de citometria de fluxo

Espécie analisada	Acesso	Local de Coleta	Espécie padrão
<i>Arthropogon villosus</i> Nees	RCO 2971	Brasil, Distrito Federal, Brasília	Soja
<i>Mesosetum alatum</i> Filg.	RCO 2765	Brasil, Mato Grosso, Água Boa	Tomate
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlmann.	RCO 2766	Brasil, Mato Grosso, Poconé	Rabanete
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlmann.	RCO 2784	Brasil, Mato Grosso, Chapada dos Guimarães	Rabanete
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15927	Brasil, Goiás, Flores de Goiás	Tomate
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15933	Brasil, Goiás, Flores de Goiás	Tomate
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	ASS 235	Brasil, Goiás, Teresina de Goiás	Tomate
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	RCO 2848	Brasil, Tocantins, Natividade	Milho
<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	AROR 362	Brasil, Goiás, Pirenópolis	Rabanete
<i>Mesosetum chaseae</i> Luces	RCO 2772	Brasil, Mato Grosso, Poconé	Tomate
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	Brasil, Pernambuco, Pesqueira	Tomate
<i>Mesosetum elytrochaetum</i> (Hack.) Swallen	AROR 377	Brasil, Goiás, Alto Paraíso	Milho
<i>Mesosetum exaratum</i> (Trin.) Chase	AROR 351	Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó	Tomate
<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>setaceum</i> Filg.	AROR 409	Brasil, Bahia, Rio de Contas	Rabanete
<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>ferrugineum</i> (Trin.) Chase	MWSS 64	Brasil, Distrito Federal, Brasília	Tomate
<i>Mesosetum loliiforme</i> (Hochst. ex Steud.) Chase	AROR 355	Brasil, Goiás, Pirenópolis	Tomate
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331	Brasil, Minas Gerais, Grão Mogol	Rabanete
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	AROR 420	Brasil, Bahia, Rio de Contas	Milho

As espécies padrão são aquelas que possuem quantidade de DNA já conhecida e foram escolhidas com base na lista padrão de Dolezel *et al.* (1992, 1998, 2005). Para cada espécie examinada foi escolhida uma espécie padrão (Tabela 1) com tamanho do genoma distinto o suficiente para evitar sobreposição entre os picos (Dolezel 1992, 1998, 2005). Com base nesses critérios, as espécies padrão selecionadas foram o rabanete (*Raphanus sativus* L. cultivar “Saxa”, $2C = 1,11$ pg), tomate (*Solanum lycopersicum* L. cultivar “Stupicke Polni Tyckove Rane”, $2C = 1,96$ pg), a soja (*Glycine max* (L.) Merr. cultivar “Polanka”, $2C = 2,50$ pg) e o milho (*Zea mays* L. cultivar “CE-777”, $2C = 5,43$ pg).

Para o preparo das amostras, 40-50 mg de tecido de folhas jovens frescas das espécies analisadas e das espécies padrão foram simultaneamente picadas para liberação dos núcleos celulares em placa petri com 750 μ L de solução tampão WPB (*Wood Plant Buffer*) descrita por Loureiro *et al.* (2007). A suspensão contendo os núcleos foi filtrada em malha de 30 μ m de poro e o conteúdo depositado em tubo de citômetro. A seguir foram adicionados mais 750 de solução tampão WPB, 20 μ L de solução de iodeto propídio (50 μ g/mL) e o tubo foi agitado para homogeneizar o corante. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em caixa com gelo até análise.

Como foi utilizado tecido somático ($2n$) de folhas, a quantidade de DNA estimada em cada núcleo representa o tamanho do genoma diplofásico ($2C$). Para estimar a quantidade de DNA do genoma de cada planta, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo Partec CyFlow SL sob feixe laser verde de 532 nm equipado com o programa Flomax (Partec), no Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, UFPE. O valor da quantidade de DNA de cada acesso foi determinado pela média de três repetições com pelo menos 1000 núcleos

avaliados em cada repetição. Foram utilizados somente histogramas com picos contendo Coeficiente de Variação menor ou igual 5%.

Para facilitar a comparação dos tamanhos dos genomas entre os distintos números cromossômicos básicos e níveis de ploidia foram calculadas a quantidade de DNA do genoma monoploide (Cx) e a quantidade média de DNA por cromossomo ($2C/2n$) de acordo com as fórmulas descritas por Greilhuber *et al.* (2005) e Leitch. *et al.* (2010). O valor de Cx é obtido pela divisão da quantidade de DNA do genoma diplofásico ($2C$) pelo número de complementos monoploides (x) do respectivo nível de ploidia (Greilhuber *et al.* 2005). O valor da quantidade média de DNA por cromossomo ($2C/2n$) é obtido pela divisão da quantidade de DNA do genoma diplofásico ($2C$) pelo número cromossômico somático ($2n$) (Leitch. *et al.* 2010).

2.3 Resultados

Foi estimada a quantidade de DNA ($2C$) por citometria de fluxo em 19 acessos incluindo uma espécie de *Arthropogon*, 13 espécies de *Mesosetum* e uma espécie de *Tatianyx* (Tabela 2, Figuras 1 e 2). Foram observados três grupos com quantidade de DNA distintas, sendo o primeiro representado pelas espécies com número básico $x = 10$, o segundo representado pela espécie com $x = 13$ e o terceiro representado pelas espécies com $x = 4$.

O clado de espécies com número básico $x = 10$ apresentou nos diploides ($2n = 20$) *M. cayennense*, *M. ferrugineum* var. *setaceum* e *M. rottboellioides* a menor quantidade de DNA entre todas as espécies estudadas, variando entre $2C = 0,8850$ pg e $2C = 1,9456$ pg (Tabela 2). O tetraploide ($2n = 40$) *Arthropogon villosus* apresentou quantidade de DNA $2C = 5,3375$ pg. Os hexaploides ($2n = 60$) *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* e *Tatianyx arnacites* apresentaram quantidades de DNA de $2C = 4,6079$ pg e $2C = 3,5951$ pg, respectivamente.

A linhagem monoespecífica de *M. exaratum* com $2n = 26$ ($x = 13$) apresentou quantidade de DNA de $2C = 3,3238$ pg (Tabela 2). Já o clado de espécies com número cromossômico básico $x = 4$ apresentou quantidade de DNA nos diploides ($2n = 8$) das espécies *Mesosetum alatum*, *M. ansatum* e *M. bifarium* variando entre $2C = 2,1264$ pg e $2C = 3,6284$ pg (Tabela 2). Para os tetraploides ($2n = 16$) de *M. bifarium* (ASS 235) e *M. compressum* (ASS 274) obteve-se $2C = 4,8023$ pg e $2C = 5,1935$ pg, respectivamente. Nos hexaploides ($2n = 24$) de *M. chaseae* e *M. elytrochaetum* foram observadas as maiores quantidades de DNA entre todas as espécies examinadas com $2C = 5,7903$ e $2C = 9,0172$ pg em *M. elytrochaetum*.

Tabela 2. Quantidade de DNA do genoma diplofásico ($2C$) das espécies de *Arthropogon*, *Mesosetum* e *Tatianyx* estimadas por citometria de fluxo, seus respectivos números cromossômicos, nível de ploidia, quantidade de DNA do genoma monoploide (Cx) e quantidade média de DNA por cromossomo ($2C/2n$)

	Espécie analisada	Acesso	Num. crom.	Nível Ploid.	2C (pg)	Cx (pg)	2C/2n (pg)
x=10	<i>Arthropogon villosus</i> Nees	RCO 2971	$2n = 40$	4x	5,3375	1,3344	0,1334
	<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	RCO 2848	$2n = 20$	2x	0,8850	0,4425	0,0443
	<i>Mesosetum cayennense</i> Steud.	AROR 362	$2n = 20$	2x	1,5171	0,7586	0,0759
	<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>setaceum</i> Filg.	AROR 409	$2n = 20$	2x	1,9456	0,9728	0,0973
	<i>Mesosetum ferrugineum</i> var. <i>ferrugineum</i> (Trin.) Chase	MWSS 64	$2n = 60$	6x	4,6079	0,7680	0,0768
	<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331	$2n = 20$	2x	1,2895	0,6448	0,0645
	<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	AROR 420	indet.	—	1,8949	—	—
	<i>Tatianyx arnacites</i> (Trin.) Zuloaga & Soderstr.	AROR 411	$2n = 60$	6x	3,5951	0,5992	0,0599
x=13	<i>Mesosetum exaratum</i> (Trin.) Chase	AROR 351	$2n = 26$	2x	3,3238	1,6619	0,1278
x=4	<i>Mesosetum alatum</i> Filg.	RCO 2765	$2n = 8$	2x	3,6284	1,8142	0,4536
	<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlman.	RCO 2766	$2n = 8$	2x	2,1264	1,0632	0,2658

<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhl.	RCO 2784	2n = 8	2x	2,1336	1,0668	0,2667
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15927	2n = 8	2x	3,0236	1,5118	0,3780
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	V 15933	2n = 8	2x	3,1131	1,5566	0,3891
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	ASS 235	2n = 16	4x	4,8023	1,2006	0,3001
<i>Mesosetum chaseae</i> Luces	RCO 2772	2n = 24	6x	5,7903	0,9651	0,2413
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	4x	5,1935	1,2984	0,3246
<i>Mesosetum elytrochaetum</i> (Hack.) Swallen	AROR 377	2n = 24	6x	9,0172	1,5029	0,3757
<i>Mesosetum loliiforme</i> (Hochst. ex Steud.) Chase	AROR 355	indet.	—	5,3743	—	—

Num. crom.: Número cromossômico (Indet.: Número cromossômico não determinado).

Nível Ploid.: Nível de Ploidia (2x: diploide; 4x: tetraploide; 6x: hexaploide).

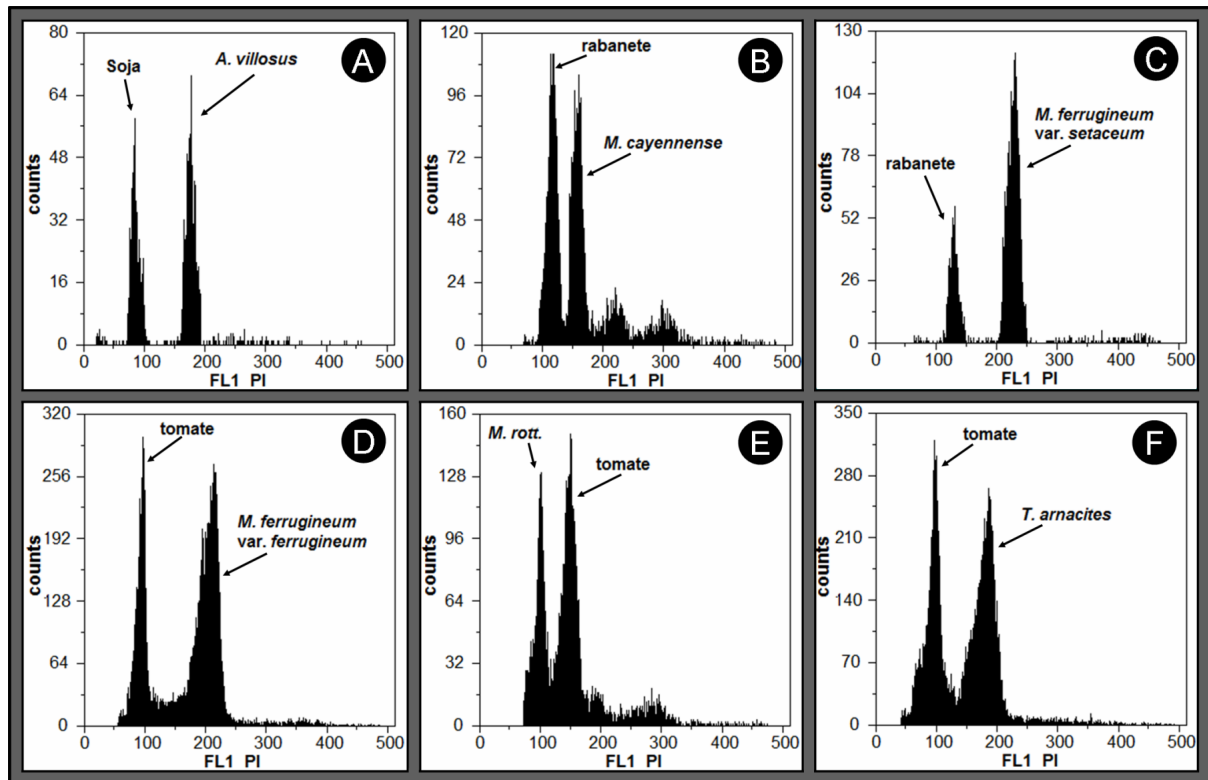


Figura 1. Histogramas das quantidades de DNA (2C) relativas obtidas de núcleos isolados em tecidos de folhas jovens em espécies de Arthropogoninae com número cromossômico básico $x = 10$. **A.** *Arthropogon villosus*, RCO 2971, $2n = 40$. **B.** *Mesosetum cayennense*, AROR 362, $2n = 20$. **C.** *M. ferrugineum* var. *setaceum*, AROR 409, $2n = 20$. **D.** *M. ferrugineum* var. *ferrugineum*, MWSS 64, $2n = 60$. **E.** *M. rottboellioides*, PAR 331, $2n = 20$. **F.** *Tatianyx arnacites*, AROR 411, $2n = 60$.

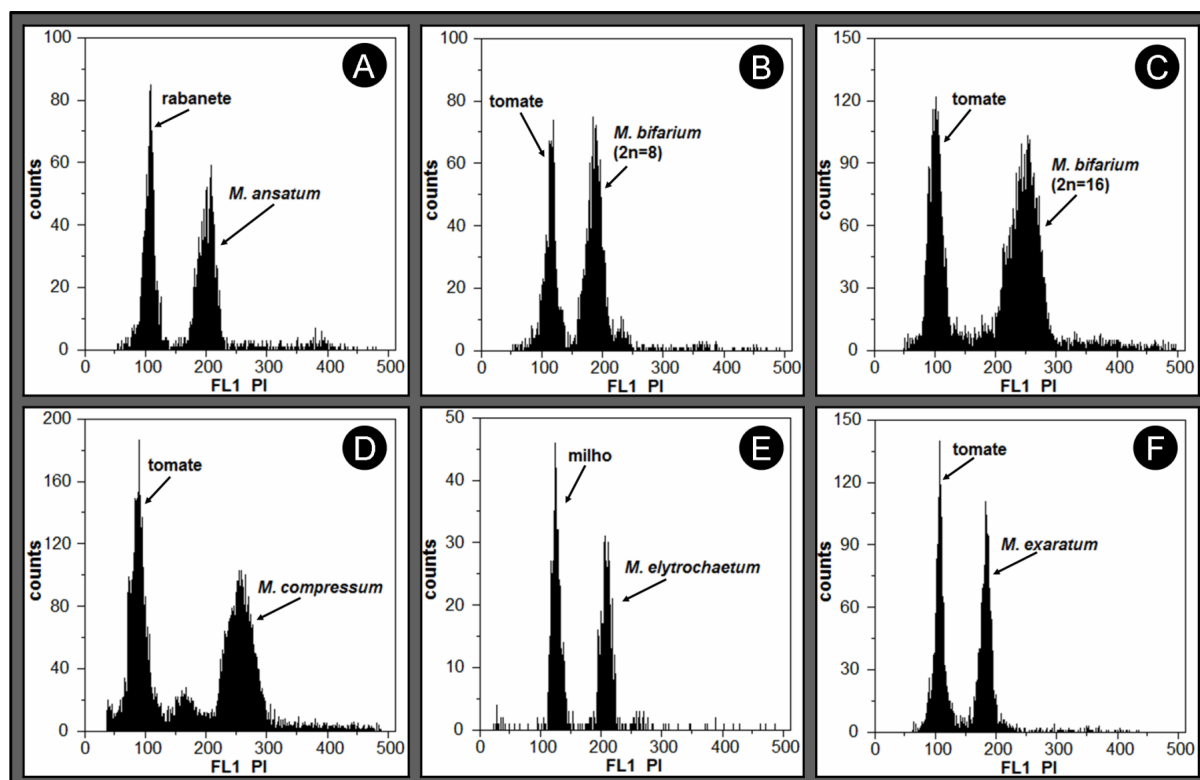


Figura 2. Histogramas das quantidades de DNA (2C) relativas obtidas de núcleos isolados em tecidos de folhas jovens em espécies de *Mesosetum* com números cromossômicos básicos $x = 10$ e $x = 13$. **A.** *Mesosetum ansatum*, RCO 2766, $2n = 8$. **B-C.** *M. bifarium*. **B.** V15933, $2n = 8$. **C.** ASS 235, $2n = 16$. **D.** *M. compressum*, ASS 274, $2n = 16$. **E.** *M. elytrochaetum* AROR 377, $2n = 24$. **F.** *M. exaratum*, AROR 351, $2n = 26$.

2.4 Discussão

As estimativas dos tamanhos dos genomas por citometria de fluxo obtidas pelo presente trabalho são pela primeira vez determinadas nos gêneros *Arthropogon*, *Mesosetum* e *Tatianyx*. Os resultados obtidos pelo presente trabalho sugerem que a evolução dos genomas das linhagens se processou de forma distinta entre os genomas com número cromossômico básico $x = 10$ na subtribo Arthropogoninae.

O tamanho do genoma monoploide do tetraploide ($2n=40$) de *Arthropogon villosus* ($Cx = 1,3344$ pg) é até três vezes maior que os genomas dos diploides ($2n=20$) de *Mesosetum cayennense* (Cx variando entre 0,4425 pg e 0,7586 pg), *M. ferrugineum* var. *setaceum* ($Cx = 0,9728$ pg) e *M. rottboellioides* ($Cx = 0,6448$ pg). O genoma do tetraploide ($2n = 40$) de *Arthropogon villosus* ($2C = 5,3375$ pg) chega a ser maior até mesmo que os genomas dos

hexaploides ($2n = 60$) de *Tatianyx arnacites* ($2C = 3,5951$ pg) e *Mesosetum ferrugineum* var. *ferrugineum* ($2C = 4,6079$ pg).

Esta diferença de tamanho entre os genomas sugere que a tendência ou linhagem evolutiva de *Arthropogon* é provavelmente diferente em relação aos dois outros gêneros aqui estudados. Enquanto em *A. villosus* provavelmente houve tendência de aumento no tamanho do genoma, nos outros gêneros de Paspaleae, como *Mesosetum*, *Paspalum* e *Tatianyx* o genoma manteve-se conservado pequeno na maioria das espécies com $x = 10$ (Vaio *et al.* 2007; Leitch *et al.* 2010; Galdeano *et al.* 2016). A análise de outras espécies de *Arthropogon* deve ser investida para melhor compreender esta tendência.

Já o tamanho do genoma do hexaploide ($2n = 60$) de *Tatianyx* ($Cx = 0,5992$ pg) é quase equivalente ao genoma do diploide ($2n = 20$) de *M. rottboellioides* ($Cx = 0,6448$ pg). Esta equivalência do tamanho dos genomas suporta o clado proposto por Morrone *et al.* (2012). Os resultados sugerem ainda que o ancestral do clado composto por *Keratochlaena*, *Mesosetum* e *Tatianyx* tinha uma baixa quantidade de DNA.

Embora os dados indiquem que o genoma do ancestral era pequeno no clado *Keratochlaena*, *Mesosetum* e *Tatianyx* houve um aumento do genoma subsequente no clado $x = 10$. Essa tendência pode ser verificada na comparação com *M. ferrugineum*. O tamanho do genoma do hexaploide ($2n = 60$) de *T. arnacites* ($2C = 3,5951$ pg) foi inferior ao acesso do também hexaploide ($2n = 60$) de *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* ($2C = 4,6079$ pg).

Dentro de *Mesosetum*, observou-se correspondência da quantidade de DNA com o tamanho dos cromossomos e o nível de ploidia reportados por Ribeiro (2013), Sousa (2014) e Ribeiro *et al.* (2015). Nos poliploides dos clados $x = 10$ e $x = 4$ foram observadas relativas perdas de DNA em comparação com os diploides. Esta redução de DNA após a poliploidização está relacionada à perda de cópias redundantes de genes, o que já foi reportado em vários gêneros de Poaceae e Panicoideae (Langham *et al.* 2004; Paterson *et al.*

2004; Murat *et al.* 2010; Schnable *et al.* 2012). Além disso, os acessos do presente estudo de citometria também foram utilizados na filogenia molecular do gênero *Mesosetum* (Silva dados não publicados) o que permitiu avaliar como o genoma evoluiu entre as distintas espécies do gênero.

O tamanho do genoma diploide das espécies do clado $x = 10$, que provavelmente é mais basal em *Mesosetum* (Silva dados não publicados), é até quatro vezes menor que o genoma diploide das espécies de *Mesosetum* com $x = 4$ e $x = 13$. Estes resultados indicam que provavelmente houve incremento no tamanho do genoma nas espécies com números $x = 4$ e $x = 13$ após sua origem a partir de um ancestral com $x = 10$. Esta expansão do genoma também é evidenciada pelos cromossomos maiores e com maior quantidade média de cromatina acumulada em cada cromossomo nas espécies com $x = 4$ (3,7-7,2 μm ; 0,24-0,45 pg) e também com $x = 13$ (2,5-5,0 μm ; 0,13 pg) em comparação às espécies com $x = 10$ (1,8-4,0 μm ; 0,04-0,010 pg) (Capítulo 1 desta tese).

No clado das espécies com $x = 10$, o tamanho do genoma dos diploides ($2n = 20$) variou entre $2C = 0,8850$ pg e $2C = 1,9456$ pg em *M. cayennense*, *M. ferrugineum* var. *setaceum* e *M. rottboellioides*. Estas quantidades de DNA foram as menores observadas entre todas as espécies analisadas. O genoma menor pode ser explicado pelo tamanho reduzido dos cromossomos que medem entre 1,8 e 4,0 μm (Capítulo 1 desta tese; Sousa 2014), o que reflete uma menor quantidade de cromatina acumulada em cada cromossomo ($2C/2n$ entre 0,0443 pg e 0,0973 pg).

Em outros gêneros de Panicoideae, genomas com tamanhos semelhantes aos das espécies de *Mesosetum* foram reportados em espécies com números cromossômicos idênticos ($2n = 20$) ou menores ($2n = 10$) (Price *et al.* 2005; Vaio *et al.* 2007).

No gênero *Paspalum* L., em espécies dos grupos Paniculata e Quadrifaria foram registrados genomas de citótipos diploides com $2n = 20$ cromossomos (Vaio *et al.* 2007)

muito próximos aos aqui observados em *Mesosetum*. Em *P. haumanii* Parodi (2C = 1,50 pg), *P. intermedium* Munro ex Morong & Britton (2C = 1,51 pg), *P. juergensii* Hack. (2C = 1,24 pg) e *P. quadrifarium* Lam. (2C = 1,87 pg) as quantidades de DNA reportadas por Vaio *et al.* (2007) foram muito similares às observadas em *M. cayennense* (2C = 1,5171 pg), *M. ferrugineum* var. *setaceum* (2C = 1,9456 pg) e *M. rottboellioides* (2C = 1,2895 pg).

No gênero *Sorghum* Moench resultados semelhantes foram obtidos para *S. bicolor* (L.) Moench (2C = 1,67 pg) e *S. propinquum* (Kunth) Hitchc. (2C = 1,51 pg), ambas com $2n = 20$ cromossomos (Price *et al.* 2005). Entretanto, o tamanho do genoma de *S. nitidum* (Vahl) Pers. (2C = 8,79 pg) também com $2n = 20$ cromossomos (Price *et al.* 2005) é até sete vezes maior que o genoma das espécies de *Mesosetum* com mesmo número cromossômico. Com base na filogenia de *Sorghum*, esta diferença de tamanho do genoma é atribuída ao fato de $2n = 20$ cromossomos ter múltiplas origens durante a evolução cromossômica do gênero *Sorghum* (Price *et al.* 2005).

De acordo com a filogenia do gênero *Mesosetum* proposta por Silva (dados não publicados), *M. ferrugineum* compõe um clado fortemente suportado com *M. cayennense* e *M. rottboellioides*. Assim é possível estabelecer comparações entre as espécies de *Mesosetum* com $x = 10$.

É bastante provável que o hexaploide ($2n = 60$) *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* surgiu por poliploidia a partir do diploide ($2n = 20$) *M. ferrugineum* var. *setaceum*. A quantidade de DNA monoploide obtida no hexaploide ($2n = 60$) de *M. ferrugineum* var. *ferrugineum* ($Cx = 0,7680$ pg) é menor que no diploide representado por *M. ferrugineum* var. *setaceum* ($Cx = 0,9728$ pg), sugerindo que houve perda de DNA após o evento de poliploidização. A perda de DNA normalmente se processa associada à diploidização (Langham *et al.* 2004; Paterson *et al.* 2004; Murat *et al.* 2010; Schnable *et al.* 2012). Entretanto, em *M. ferrugineum*, a ausência de informações sobre a meiose impossibilita

verificar se houve uma estabilização do pareamento em bivalentes no poliploide com $2n = 60$ cromossomos. Vale salientar que esta espécie floresce apenas após incêndios em habitat natural e ainda não houve sucesso na indução de florescimento em ambientes cultivados, impossibilitando os estudos de meiose.

As espécies com número cromossômico básico $x = 4$ na filogenia molecular de *Mesosetum* (Silva dados não publicados) compõe um clado que pode ser subdividido em subclados principais altamente suportados que corroboram com os dados de citometria de fluxo do presente trabalho. Há um subclado monoespecífico que agrupa os dois acessos diploides de *M. ansatum* com $2n = 8$ cromossomos (Ribeiro 2013 e Ribeiro *et. al.* 2015; Silva dados não publicados). Há outro subclado entre as espécies com $x = 4$ composto por *M. alatum*, *M. bifarium*, *M. chaseae*, *M. compressum* e *M. elytrochaetum* (Silva dados não publicados).

O tamanho do genoma de *M. ansatum* ($2C$ entre 2,1264 pg e 2,1336 pg) é no mínimo 30 % menor que os genomas de outras espécies diploides ($2n = 8$) do subclado irmão ($2C$ entre 3,0236 pg e 3,6284 pg). Estes resultados indicam que há pelo menos duas linhagens distintas na evolução genômica das espécies com $x = 4$.

Foram examinados 3 citótipos de *M. bifarium*, os dois primeiros, representados pelos acessos V15927 e V 15933 diploides ($2n = 8$), e o terceiro, representado pelo acesso ASS 235 tetraploide natural ($2n = 16$). A quantidade de DNA monoploide da planta tetraploide ASS 235 ($Cx = 1,2006$ pg) é inferior à observada nas plantas diploides (Cx entre 1,5118 pg e 1,5566 pg). Estes dados sugerem que houve perda de DNA no acesso tetraploide ($2n = 16$) após o processo de poliploidização. Esta perda de DNA está relacionada à diploidização comprovada na estabilidade da meiose do tetraploide ASS 235, que apresentou pareamento predominante em bivalentes em mais de 86% das diacineses examinadas (Ribeiro 2013).

O mesmo parece ter ocorrido com *M. compressum* que também está no mesmo subclado de *M. bifarium*. O tamanho do genoma monoploide do tetraploide ($2n = 16$) de *M. compressum* ($Cx = 1,2984$ pg) é inferior ao observado nos diploides ($2n = 8$) de *M. bifarium* (Cx entre 1,5118 pg e 1,5566 pg). A meiose estável de *M. compressum* mostra que a perda de genes e a redução do genoma também ocorreu paralela ao processo de diploidização comprovada na meiose estável com mais de 90% das diacineses com pareamento em bivalentes.

O acesso hexaploide ($2n = 24$) de *M. elytrochaetum* forma um clado altamente suportado com os dois acessos diploides de *M. bifarium* (Silva dados não publicados). A quantidade de DNA monoploide do hexaploide natural ($2n = 24$) de *M. elytrochaetum* ($Cx = 1,5029$ pg) é quase equivalente à observada nos diploides de *M. bifarium* (Cx entre 1,5118 pg e 1,5566 pg). Estes resultados indicam que o tamanho do genoma de *M. elytrochaetum* manteve-se praticamente estável após o processo de poliploidização, com pequena perda de DNA.

Em *M. loliiforme* foram examinados três acessos, porém foram obtidos picos bem definidos apenas no acesso AROR 355. Provavelmente, a espécie deve apresentar compostos bioquímicos que interferem na fluorescência dos núcleos e nos resultados obtidos, sendo necessário ajustar uma solução tampão mais adequada. A única planta examinada com sucesso apresentou $2C = 5,3743$ pg. Devido à ausência de florescimento, foram coletadas raízes para análise dos cromossomos em mitose. Porém não houve sucesso e as mudas de *M. loliiforme* por serem mais sensíveis não sobreviveram à coleta de raízes.

A linhagem monoespecífica de *M. exaratum* com número cromossômico básico $x = 13$ representa uma linha evolutiva bastante peculiar. A ausência deste número cromossômico ($2n = 26$) em outras Panicoideae ou mesmo outras espécies de *Mesosetum* limita a comparação dos resultados obtidos. Em *Mesosetum* o número cromossômico mais próximo é $2n = 20$. A

quantidade média de DNA por cromossomo observada em *M. exaratum* ($2C/2n = 0,1278$ pg) é até quase 3 vezes maior que nos diploides com $x = 10$ ($2C/2n$ variando entre 0,0443 pg e 0,0973 pg). Estes resultados indicam que houve aumento do tamanho do genoma após a origem do número cromossômico básico $x = 13$ a partir de $x = 10$. Esta expansão do genoma está estritamente associada ao tamanho dos cromossomos de *M. exaratum* que são maiores que os observados nos diploides com $x = 10$ (Sousa 2014; Capítulo 1).

2.5 Conclusão

A comparação dos resultados do presente estudo de citometria aliada à análise dos trabalhos de Ribeiro (2013), Sousa (2014), Ribeiro *et al.* (2015), Silva (dados não publicados), além dos dados do Capítulo 1 desta tese permitem elaborar algumas hipóteses para evolução do gênero *Mesosetum*.

É bastante provável que a linhagem mais basal do gênero *Mesosetum* com $x = 10$ tivesse baixa quantidade de DNA e cromossomos pequenos como os observados em *M. cayennense*, *M. ferrugineum* e *M. rottoboellioides*.

Já nas espécies de *Mesosetum* do clado $x = 4$ houve ganho de DNA após sua origem a partir de cariótipo ancestral com cromossomos menores. Esta expansão do tamanho do genoma refletiu no aumento do tamanho dos cromossomos do clado $x = 4$. Novos estudos de caracterização cromossômica, molecular e por citometria de fluxo devem ser estimuladas para se compreender a evolução das espécies de *Mesosetum*.

2.6 Referências

Adoukonou-Sagbadja H, Schubert V, Dansi A, Jovtchev G, Meister A, Pistrick K, Akpagana K, Friedt W (2007) Flow cytometric analysis reveals different nuclear DNA contents in

- cultivated Fonio (*Digitaria* spp.) and some wild relatives from West-Africa. *Journal of Plant Research* 267: 163-176
- Burke SV, Wysocki WP, Zuloaga FO, Craine JM, Pires JC, Edger PP, Mayfield-Jones D, Clark LG, Kelchner SA, Duvall MR (2016) Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (Panicoideae; Poaceae). *BMC Plant Biology* 16(140): 1-11
- Celarier R, Paliwal R (1957) Basic chromosome number of four in the subfamily Panicoideae of the Gramineae. *Science* 126: 1247
- Chae WB, Hong SJ, Gifford JM, Rayburn AL, Widholm JM, Juvik JA (2013) Synthetic polyploid production of *Miscanthus sacchariflorus*, *Miscanthus sinensis*, and *Miscanthus x giganteus*. *Global Change Biology Bioenergy* 5: 338–350
- Cidade FW, Dall’Agnol M, Bered F, Souza-Chies TTd (2008) Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 235-246
- De Wet JMJ (1987) Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass systematics and evolution*, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, pp 188-194
- Dolezel J, Sgorbati S, Lucretti S (1992) Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 625-631
- Dolezel J, Greilhuber J, Lucretti S, Meister A, Lysak MA, Nardi L, Obermayer R (1998) Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter-laboratory Comparison. *Annals of Botany* 82 (Supplement A): 17-26
- Dolezel J, Bartos J (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany* 95: 99–110

- Filgueiras TS (1986) O gênero *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil
- Filgueiras TS (1989) Revisão de *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). *Acta Amazônica* 19: 47-114
- Filgueiras TS, Silva AS, Oliveira RC (2016) *Mesosetum* In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13355>, Accessed 18 Jan. 2016
- Galdeano F, Urbani MH, Sartor ME, Honfi AI, Espinoza F, Quarín CL (2016) Relative DNA content in diploid, polyploid, and multiploid species of *Paspalum* (Poaceae) with relation to reproductive mode and taxonomy. *Journal of Plant Research* 129(4): 697-710
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysák MA, Bennett MD (2005) The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms ‘Genome Size’ and ‘C-Value’ to Describe Nuclear DNA Contents. *Annals of Botany* 95: 255–260
- Hilu K (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52: 13-22
- Hunziker JH, Stebbins GL (1987) Chromosome evolution in the Gramineae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass Systematics and Evolution*, Smithsonian Inst., Washington, pp 179-187
- Langham RJ, Walsh J, Dunn M, Ko C, Goff SA, Freeling M (2004) Genomic duplication, fractionation and the origin of regulatory novelty. *Genetics* 166: 935-945
- Layton DJ, Kellogg EA (2014) Morphological, phylogenetic, and ecological diversity of the new model species *Setaria Viridis* (Poaceae: Paniceae) and its close relatives. *American Journal of Botany* 101(3): 539-557
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome Size Dynamics and Evolution in Monocots. *Journal of Botany* ID 862516: 1-18

- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C (2007) Two New Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry: A Test with 37 Species. *Annals of Botany* 100: 875-888
- Morrone O, Escobar A, Zuloaga FO (2006) Chromosome studies in American Panicoideae (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 647-657
- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA, Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Sede SM, Giussani LM, Kellogg EA, Zuloaga FO (2012) Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28: 333-356
- Murat F, Xu J-H, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research* 20: 1545-1557
- Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9903-9908
- Pozzobon MT, Paganella MB, Santos S, Valls JFM (2013) Cytological and reproductive aspects in the Caespitosa group of *Paspalum*. *Ciência Rural* 43 (11): 2004-2010
- Price HJ, Dillon SL, Hodnett G, Rooney WL, Ross L, Johnston JS (2005) Genome Evolution in the Genus *Sorghum* (Poaceae). *Annals of Botany* 95: 219-227
- Ribeiro ARO (2013) Citogenética, reprodução e variabilidade morfológica de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase (Poaceae: Paniceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Ribeiro ARO, Sousa MWS, Oliveira RC, Araujo ACG, Fagg CW, Pozzobon MT (2015) Cytological studies in four species of *Mesosetum* (Arthropogoninae) reveal the lowest chromosome number among the Neotropical Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301(10): 2377-2386

- Schapova AI (2012) Evolution of the Basic Chromosome Number in Poaceae Barnh. Russian Journal of Genetics: Applied Research 2(3): 252-259
- Schnable JC, Freeling M, Lyons E (2012) Genome-Wide Analysis of Syntenic Gene Deletion in the Grasses. Genome Biology and Evolution 4(3): 265-277
- Sede S, Escobar A, Morrone O, Zuloaga FO (2010) Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae-Panicoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden 97: 128-138
- Silva AS, Villarroel D, Ribeiro ARO, Oliveira RC (2016) Eleven new records of little known taxa of *Mesosetum* and *Paspalum* (Poaceae) from Brazil and Bolivia. Phytotaxa 268(1): 069-079
- Sousa MWS (2014) Citogenética e morfologia de espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae, Paspaleae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- SpeciesLink (2016) Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA. Available at: <http://www.splink.org.br/>, Accessed 1 Nov. 2016
- Studer AJ, Schnable JC, Weissmann S, Kolbe AR, McKain MR, Shao Y, Cousins AB, Kellogg EA, Brutnell TP (2016) The draft genome of the C3 panicoid grass species *Dichanthelium oligosanthes*. Genome Biology 17(223): 1-18
- Swallen JR (1937) The grass genus *Mesosetum*. Brittonia 2(4): 363-392
- Thiers B (2016) Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. (Continuously Updated). Available at: <http://sweetgum.nybg.org/ih/> Accessed 01 Nov. 2016
- Vaio M, Mazzella C, Porro V, Speranza P, López-Carro B, Estramil E, Folle GA (2007) Nuclear DNA content in allopolyploid species and synthetic hybrids in the grass genus *Paspalum*. Plant Systematics and Evolution 265: 109-121

Wang X, Wang J, Jin D, Guo H, Lee T-H, Liu T, Paterson AH (2015) Genome Alignment Spanning Major Poaceae Lineages Reveals Heterogeneous Evolutionary Rates and Alters Inferred Dates for Key Evolutionary Events. *Molecular Plant* 8: 885-898

CAPÍTULO 3

**Estudos de citogenética molecular em espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase
(Poaceae: Arthropogoninae)**

3.1 Introdução

As técnicas de citogenética molecular com hibridização *in situ* fluorescente (sigla FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization*) têm sido úteis para distinção cariotípica e estudo da evolução genômica de poliploides em Poaceae (Cremonini *et al.* 2003, Kotseruba *et al.* 2003, 2005, Cremonini 2005, Vaio *et al.* 2005, Kim *et al.* 2009, Nielen *et al.* 2010; Amosova *et al.* 2015). As sequências repetitivas de DNA ribossômico (DNAr), os *loci* para o DNAr 5S e DNAr 45S, podem ser identificados em um ou mais sítios com posições características, fornecendo marcas que caracterizam cromossomos ou cariótipos (Cremonini *et al.* 2003, Kotseruba *et al.* 2003, Cremonini 2005; Vaio *et al.* 2005, Nielen *et al.* 2010).

Apesar desta ferramenta já ter sido empregada em várias gramíneas de uso agrônômico (Jiang & Gill 1994, Shishido *et al.* 2000, Sang & Liang, 2000, Brasileiro-Vidal *et al.* 2003, Harper *et al.* 2004, Ferrari 2010), raros são os trabalhos utilizando FISH em gramíneas nativas. Entre os estudos com enfoque citotaxonômico para Paniceae *s.l.* nativas destacam-se os de Vaio *et al.* (2005) e Santos (2007).

O trabalho de Vaio *et al.* (2005) forneceu parâmetros para a distinção de espécies de *Paspalum* L. grupo Quadrifaria, a caracterização de diferentes versões do genoma I e permitiu propor eventos de hibridação entre diferentes espécies do grupo. Santos (2007) verificou em *Axonopus* ser. *Suffulti* G.A. Black caracteres nas bandas CMA/DAPI para distinção das espécies e também a duplicação dos sítios de DNAr 45S em poliploides.

O reconhecimento dos pares cromossômicos pela presença de sítios de DNAr 5S e 45S é ainda mais eficiente na caracterização do complemento genômico básico de gramíneas com número cromossômico baixo (Cremonini *et al.* 2003, Kotseruba *et al.* 2003, 2005, Cremonini 2005; Kotseruba *et al.* 2010).

Nas espécies *Colpodium versicolor* (Steven) Schmalh. e *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P.A. Smirn., subfamília Pooideae, tribo Poeae, foi encontrado $2n = 4$, o qual é menor

número cromossômico já registrado em Poaceae. O número cromossômico $2n = 4$ ($x = 2$) também é o menor já observado entre as angiospermas, sendo registrado somente nas famílias Asteraceae, Cyperaceae e Poaceae (Cremonini *et al.* 2003, Michelan *et al.* 2012).

Na tribo Poeae, o número cromossômico básico $x = 7$ é considerado o mais basal e predomina na maioria de suas espécies, a partir do qual o número cromossômico $2n = 4$ ($x = 2$) derivou-se por fusão e rearranjos (Cremonini *et al.* 2003; Kotseruba *et al.* 2003, 2005; Kim *et al.* 2009; Kotseruba *et al.* 2010). A partir de estudos moleculares combinados com ensaios de FISH e GISH (*Genome In Situ Hybridization*), foi possível verificar que *Zingeria biebersteiniana* (Claus) P.A. Smirn. ($2n = 4$, $x = 2$) originou por alopoliploidia o genoma com $2n = 8$ cromossomos de *Z. trichopoda* (Boiss.) P.A. Smirn. Foram observados dois sítios de 5S no *Z. biebersteiniana* ($2n = 4$) e 4 sítios de 5S em *Z. trichopoda* ($2n = 8$) o que comprovou o nível diploide em $2n = 4$ ($x = 2$) e nível alotetraploide em $2n = 8$.

Na subfamília Panicoideae, as mudanças do cariótipo também estão diretamente relacionadas com a evolução do genoma de suas espécies (Hilu 2004; Leitch *et al.* 2010; Murat *et al.* 2010; Burke *et al.* 2016; Studer *et al.* 2016). Há grande diversidade de números cromossômicos em Panicoideae, com predomínio de múltiplos de $x = 5$, $x = 9$ e $x = 10$ (Hilu 2004; Murat *et al.* 2010; Studer *et al.* 2016). Não obstante, também já foram registrados números cromossômicos básicos mais raros como $x = 4$ em Panicoideae (Celarier & Paliwal 1957; Rao 1975; De Wet 1987; Morrone *et al.* 2012; Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). O gêneros *Iseilema* Anderson. (tribo Andropogoneae) e *Mesosetum* Steud. (tribo Paspaleae) são os únicos gêneros de Panicoideae com registro do número cromossômico básico $x = 4$ cuja origem ainda não foi plenamente elucidada.

O número cromossômico $2n = 8$ ($x = 4$) encontrado em *Mesosetum* é o menor já observado na tribo Paspaleae e entre todas as gramíneas neotropicais (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015). O número cromossômico $2n = 8$ já foi observado em seis espécies

dispersas entre as seções *Bifaria* (Hack.) Chase e *Loliiformia* Swallen: *M. alatum* Filg., *M. annuum* Swallen, *M. ansatum* (Trin.) Kuhlm., *M. bifarium* (Hack.) Chase, *M. longiaristatum* Filg., *M. pappophorum* (Nees) Kuhlm. (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015; Capítulo 1 desta tese).

De acordo com Filgueiras (1986, 1989), Ribeiro (2013) e Silva *et al.* (2015), *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase contém sete espécies e forma um grupo homogêneo morfológicamente, sendo reconhecido pelas inflorescências com ráquis alada, espiguetas com achatamento lateral e gluma inferior aristada e/ou mucronada. Apesar de a seção ser prontamente reconhecida pelos caracteres morfológicos, a delimitação entre suas espécies é complexa pelo alto nível de semelhança morfológica compartilhado por elas.

Estudos com enfoque citotaxonômico na seção *Bifaria* encontraram números cromossômicos $2n = 8$, 16 e 24 e observaram indícios de poliploidia na evolução de suas espécies (Ribeiro 2013; Ribeiro *et al.* 2015).

A filogenia baseada em dados moleculares no gênero *Mesosetum* combinada a estudos citogenéticos mostra que o número cromossômico $x = 10$ é provavelmente mais basal no gênero, a partir do qual derivou-se por redução o número básico $x = 4$ (Silva dados não publicados; Capítulo 1 desta tese).

Uma redução abrupta de $x = 10$ para $x = 4$ por perda de 6 pares cromossômicos é pouco provável, pois comprometeria mais da metade do genoma original afetando genes e codificação de proteínas (Capítulo 1 desta tese). A hipótese de fusão e rearranjos cromossômicos é mais plausível para origem do número básico $x = 4$ a partir de $x = 10$ (Capítulo 1 desta tese). Entretanto ainda é desconhecida a composição e estrutura da cromatina dos cromossomos dos diploides ($2n = 8$). Também é desconhecido qual mecanismo se processou durante a poliploidização, que originou os números cromossômicos $2n = 16$ e $2n = 24$ e se ocorreram mudanças estruturais nos poliploides.

O objetivo do Capítulo 3 desta tese de doutorado foi caracterizar por meio da técnica de hibridização *in situ* FISH os cromossomos de espécies de *M. sect. Bifaria* em distintos níveis de ploidia, visando ampliar o conhecimento acerca da evolução e origem do número cromossômico básico $x = 4$ em *Mesosetum*.

3.2 Material e Métodos

Obtenção de metáfases mitóticas e lâminas

As mudas de quatro acessos (Tabela 1) de *Mesosetum ansatum* (Trin.) Kuhl., *M. chaseae* Luces, *M. compressum* Swallen e *M. elythrochaetum* (Hack.) Swallen foram cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Citogenética Vegetal, Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 1. Espécies de *Mesosetum* e respectivos acessos caracterizados via citogenética molecular

Espécie	Acesso	Número cromossômico	Local de Coleta
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhl.	RCO 2766	2n = 8	Brasil, Mato Grosso, Poconé
<i>Mesosetum chaseae</i> Luces	RCO 2772	2n = 24	Brasil, Mato Grosso, Poconé
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	Brasil, Pernambuco, Pesqueira
<i>Mesosetum elythrochaetum</i> (Hack.) Swallen	AROR 377	2n = 24	Brasil, Goiás, Alto Paraíso

Para a obtenção de metáfases mitóticas os ensaios foram baseados e adaptados dos protocolos de Pedrosa *et al.* (2002) e Sousa *et al.* (2012). As pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com solução antimitótica de 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 20h a 10°C e fixadas em solução 3:1 (metanol: ácido acético, v/v) em temperatura ambiente por pelo menos 2h e depois armazenadas a -20°C. O meristema foi previamente amolecido com enzima pectinase-celulase 20-2 % por 90 min a 37 °C. As lâminas foram preparadas com ácido acético 60% e a secagem foi feita sobre placa aquecedora em temperatura de 50-55°C, conforme o protocolo de Ruban *et al.* (2014). As melhores lâminas com pelo menos 10

metáfases espalhadas permitindo a distinção dos cromossomos foram selecionadas sob microscopia em contraste de fase do Microscópio LEICA para realização da hibridização.

As lâminas selecionadas foram envelhecidas por no mínimo 3 dias, no escuro, e seguiram para a FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) com base no protocolo de Pedrosa *et al.* (2002).

Sondas, mistura de hibridização, anticorpos e fluorocromos

Duas sondas foram utilizadas na hibridização *in situ*, a primeira sonda para localizar os sítios de DNA ribossômico (DNAr) 5S e a segunda, para os sítios de DNAr 45S nos cromossomos. A primeira sonda foi obtida a partir de um clone do plasmídeo D2 contendo fragmento de 500 bp incluindo o gene 5S de DNA ribossômico (DNAr) de *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen, conforme descrito por Pedrosa *et al.* (2002). A segunda sonda foi obtida a partir do plasmídeo pTa71 contendo fragmento de 9 kb incluindo os genes 18S-25S-5.8S de DNAr de *Triticum aestivum* L., conforme descrito por Gerlach & Bedbrook (1979). Ambas as sondas foram marcadas com Nick Translation Mix (Roche), a sonda de DNAr 5S com Cy3-dUTP (Roche) e a sonda de DNAr 45S com digoxigenina-11-dUTP (Roche). A digoxigenina da sonda de DNAr 45 foi detectada pois dois anticorpos: o primário antidigoxigenina conjugado com FITC obtido de ovelha (Roche 1207741) e o secundário anti-ovelha conjugado com FITC obtido de macaco (Serotec Star88F). Na hibridização *in situ* dos cromossomos, o fluorocromo Cy3 emite sinal de coloração alaranjada nos sítios de DNAr 5S e o fluorocromo FITC emite sinal de coloração esverdeada aos sítios de DNAr 45S.

A mistura de hibridização definiu estringência de 76% para a FISH e foi preparada contendo formamida 50% (v/v), sulfato de dextrano 10% (m/v), tampão SSC (cloreto de sódio, citrato de sódio) em concentração final 2X e as duas sondas a 5 ng/μL. A FISH seguiu 4 etapas: pré-tratamento, hibridização, lavagem e detecção.

Etapas da hibridização

No pré-tratamento, as lâminas foram encubadas com solução de RNase (100 µg/mL) por 1h a 37°C e lavadas 3 vezes com SSC 2X por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram encubadas por 20 min, a 37°C, com 100 µL de solução de pepsina a 10 µg/mL (diluída em HCL 0,01N) e lavadas 3 vezes com SSC 2X por 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram fixadas por 10 min em solução de formaldeído 3,7% (v/v) diluído em tampão PBS (fosfato salino) em concentração final 1X e lavadas 3 vezes com SSC 2X por 5 minutos. Após a fixação, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica por 3 min em etanol 70 % e 3 min em etanol 100%. Posteriormente, as lâminas foram secas ao ar por pelo menos 1h.

Na hibridização, as lâminas receberam 10 µL da solução de hibridização e desnaturadas em termociclador com adaptador para hibridização *in situ* a 94°C por 90s. Imediatamente após a desnaturação, as lâminas foram vedadas nas bordas com cola plástica de PVC e encubadas em câmara úmida a 37°C em overnigh.

As lavagens pós-hibridização foram feitas em tampão SSC. A 1ª lavagem foi feita em SSC 2X a temperatura ambiente por 5 min e as lâminas removidas cuidadosamente. A 2ª lavagem foi feita em SSC 2X por 5 min a 42°C. A 3ª e 4ª lavagens foram feitas em SSC 0,1X por 5 min. A 4ª lavagem foi feita com SSC 2X por 5 min a 42°C e a 5ª lavagem com SSC 2X a temperatura ambiente por 10 min.

Para detecção imunológica, as lâminas foram encubadas a 37°C por 30 min em câmara úmida com 100 µL de solução de albumina de soro bovino 3% diluída em PBS 1X (BSA 3%/PBS 1X). A seguir, as lâminas receberam 20 µL de solução contendo 0,4 µL do anticorpo primário e 19,6 µL de BSA 3%/PBS 1X e foram encubadas em câmara úmida a 37°C por 1h. Em seguida, as lâminas foram lavadas 3 vezes em solução de Tween 20 diluído a 0,1% em PBS 1X por 5 min. Posteriormente, as lâminas receberam 20 µL de solução contendo 0,2 µL

do anticorpo secundário e 19,8 µL de BSA 3%/PBS 1X e foram encubadas em câmara úmida a 37°C por mais 1h. Em seguida, foram novamente lavadas 3 vezes em solução de Tween 20 diluído a 0,1% em PBS 1X por 5 min. As lâminas foram montadas com 8 µL solução DAPI/Vectashield[®] (Vector) e as lamínulas vedadas com esmalte incolor. Para evitar desvanecimento do sinal fluorescente, lâminas foram armazenadas em condição escura a 4°C até a análise.

As lâminas foram observadas e fotografadas sob microscópio LEICA DMLB de epifluorescência, utilizando filtros apropriados e software LEICA Q-FISH. As imagens foram editadas utilizando-se Adobe Photoshop 12.0 (Figuras 1 e 2).

Os idiogramas (Figuras 3 e 4) foram determinados de acordo a homologia das bandas DAPI e sítios de DNAr 5S e 45S. Os pares foram numerados em ordem decrescente em relação ao comprimento do braço cromossômico mais curto e tamanho cromossômico total, baseando-se em Souza *et al.* (2009).

3.3 Resultados

Foram obtidas bandas em DAPI e hibridizações de DNAr em metáfases de *M. ansatum* (2n = 8), *M. compressum* (2n = 16), *M. chaseae* (2n = 24) e *M. elytrochaetum* (2n = 24). Em todos os cromossomos das espécies estudadas observou-se coloração DAPI na região pericentromérica. Em pelo menos um par de cada espécie foram observadas marcações de DNAr 5S e DNAr 45S em sítios terminais ou subterminais dos cromossomos (Figura 1, Figura 2).

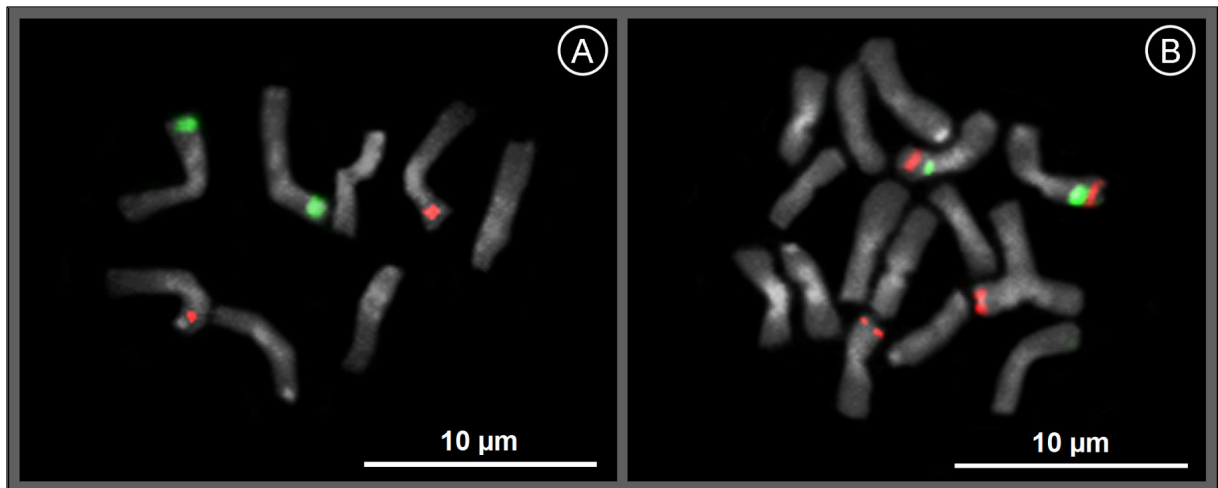


Figura 1. Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 8$ e $2n = 16$ cromossomos após hibridização *in situ* com DNAr 5S (fluorescente em alaranjado) e DNAr 45S (fluorescente em verde) com contracoloração em DAPI (cinza) vistas em microscópio com epifluorescência. **A.** *M. ansantum* (RCO 2766). **B.** *M. compressum* (ASS 274).

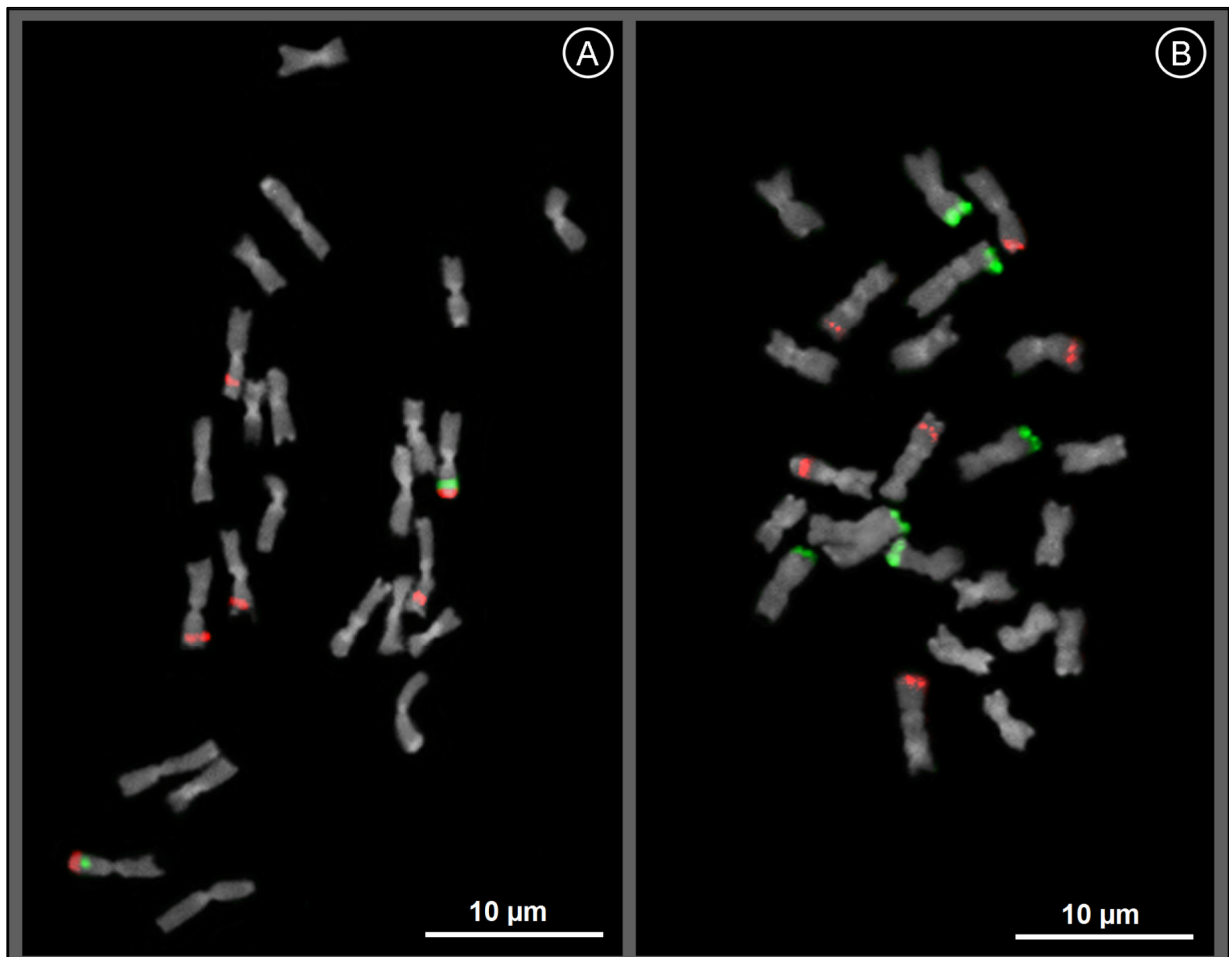


Figura 2. Metáfases mitóticas de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 24$ cromossomos após hibridização *in situ* com DNAr 5S (fluorescente em alaranjado) e DNAr 45S (fluorescente em verde) com contracoloração em DAPI (cinza) vistas em microscópio com epifluorescência. **A.** *M. chaseae* (RCO 2772). **B.** *M. elytrochaetum* (AROR 377).

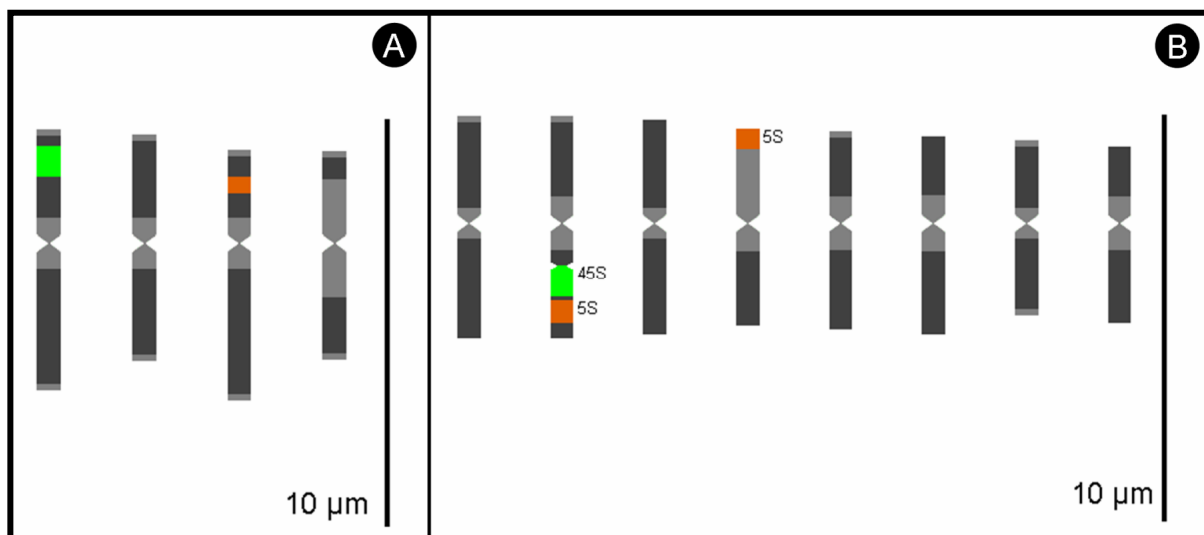


Figura 3. Idiogramas das espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 8$ e $2n = 16$ cromossomos com sítios de DNAr 5S (laranja), DNAr 45S (verde) e bandas DAPI (cinza). **A.** *M. ansantum* (RCO 2766). **B.** *M. compressum* (ASS 274).

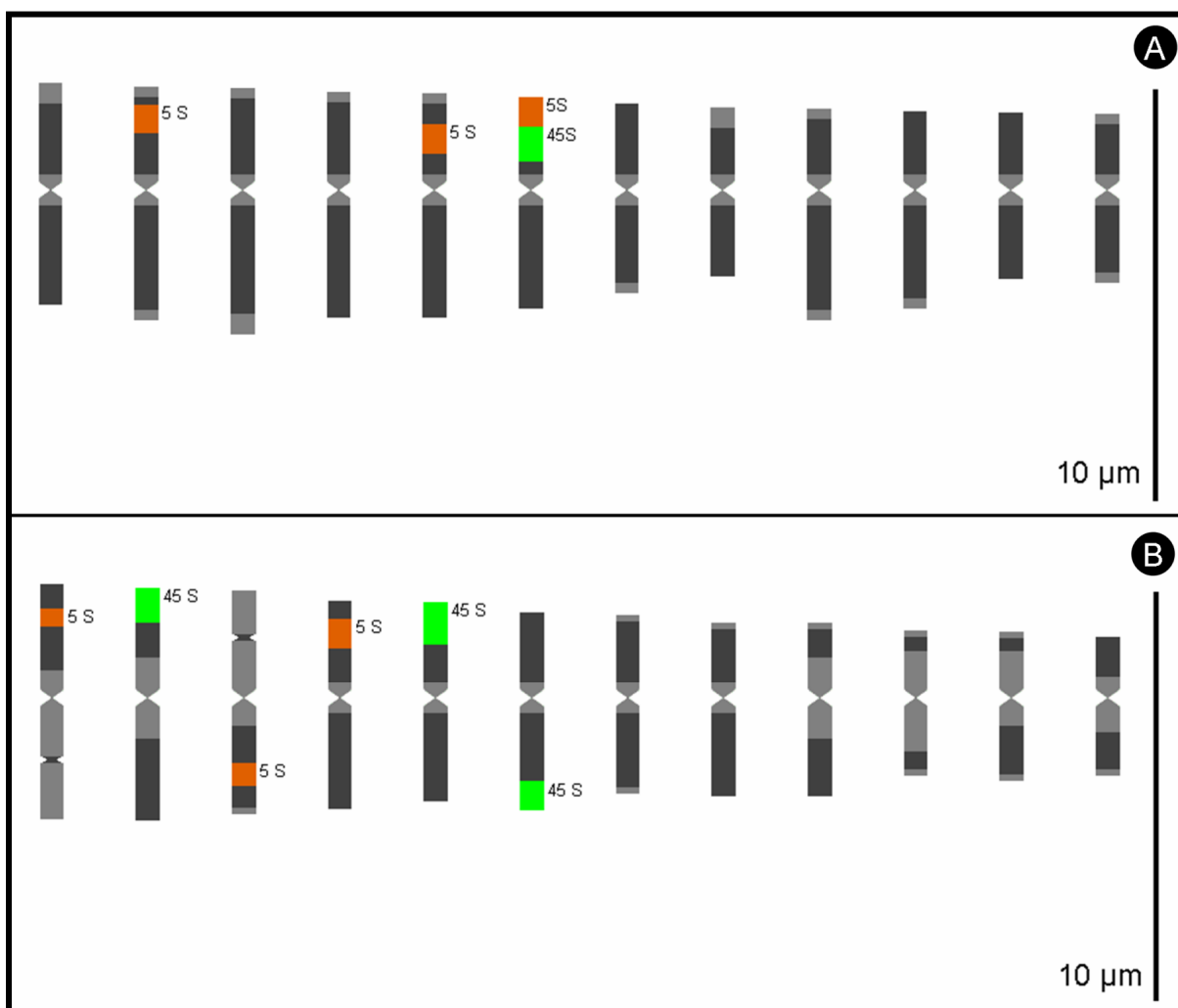


Figura 4. Idiogramas das espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* com $2n = 24$ cromossomos com sítios de DNAr 5S (laranja), DNAr 45S (verde) e bandas DAPI (cinza). **A.** *M. chaseae* (RCO 2772). **B.** *M. elytrochaetum* (AROR 377).

Em *M. ansatum* ($2n = 8$) foram observados dois pares com marcações de DNAr, um com 5S e outro com 45S. Em todos os cromossomos verificou-se uma intensa coloração DAPI terminal em ambos os braços, especialmente no braço curto (Figuras 1A, 3A). O par 1 apresentou um sítio subterminal de DNA 45S no braço curto (Figuras 1A, 3A). No par 3 foi verificada a ocorrência de sítio subterminal de DNAr 5S também no braço curto (Figuras 1A, 3A). Os outros dois pares foram diferenciados pela heterocromatina, sendo no par 2 a banda DAPI mais restrita a região pericentromérica e no par 4 a banda DAPI se estende desde a região pericentromérica até a porção subterminal do braço curto (Figuras 1A, 3A).

Em *M. compressum* ($2n = 16$) foram observados dois pares cromossômicos com sítios de DNAr, correspondentes ao par 2 e ao par 4 do cariótipo (Figuras 1B, 3B). No par 2 os dois sítios sintênicos de DNAr foram marcados no satélite, com um sítio de DNAr 5S subterminal e um sítio de DNAr 45S na constrição secundária (Figuras 1B, 3B). Ainda no par 2 foram observadas bandas de DAPI em mais duas regiões além da pericentromérica, uma subterminal no braço longo e outra colocalizada com o sítio de DNAr 45S (Figuras 1B, 3B). O par 4 foi marcado no braço curto com um sítio de DNAr 5S terminal e uma banda de DAPI subterminal. Bandas DAPI terminais nos braços curtos também foram observadas nos pares 1, 5 e 7, sendo no par 7 também observadas no braço longo.

Em *M. chaseae* ($2n = 24$) os sítios de DNAr foram detectados em 3 pares cromossômicos, correspondentes aos pares 2, 5 e 6 do cariótipo (Figuras 2A, 4A). Os pares 2 e 5 foram marcados com um sítio subterminal de DNAr 5S no braço curto (Figuras 2A, 4A). O par 6 foi marcado com dois sítios sintênicos no braço curto, um terminal com DNAr 5S e outro subterminal com DNAr 45S (Figuras 2A, 4A). Foram observadas bandas terminais DAPI em todos os pares, exceto no par 11 (Figuras 2A, 4A).

Em *M. elytrchaetum* ($2n = 24$) os sítios de DNAr foram detectados em 6 pares cromossômicos, correspondentes aos pares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (Figuras 2B, 4B). Os pares 2, 5 e 6

foram marcados com um sítio terminal de DNAr 45S, sendo nos pares 2 e 5 localizado no braço curto e no par 6 localizado no braço longo (Figuras 2B, 4B). No par 5 este sítio de DNAr 45S emite do sinal é colocalizado com uma banda DAPI terminal (Figuras 2B, 4B). Os pares 1, 3 e 4 foram marcados com um sítio de DNAr 5S subterminal, sendo localizado nos braços curtos dos pares 1 e 4 e no braço longo do par 3 (Figuras 2B, 4B). Foram observadas bandas terminais DAPI nos pares 7, 8, 9, 10, 11 e 12 (Figuras 2B, 4B).

3.4 Discussão

As colorações DAPI somadas às marcações de DNAr 5S e 45S foram úteis à distinção dos pares cromossômicos e determinação do cariótipo e são pela primeira vez estudadas e descritas no gênero *Mesosetum* e na subtribo Arthropogoninae.

As bandas DAPI estão associadas ao acúmulo de heterocromatina rica em DNA repetitivo AT (Souza *et al.* 2009; Souza *et al.* 2012) e foram observadas na região pericentromérica e também próximo à constrição secundária. Esta heterocromatina pericentromérica pode apresentar função de estabilizar o centrômero e garantir regularidade na segregação dos cromossomos durante a mitose e meiose, além participar na formação dos cromocentros durante a interfase, contribuindo na condensação e estruturação dos cromossomos (Simon *et al.* 2015).

Estas bandas DAPI nas regiões pericentroméricas foram distintas em alguns cromossomos, se estendendo por quase todo o braço cromossômico, semelhante ao observado em espécies de *Paspalum* por Vaio *et al.* (2005) e auxiliaram na distinção dos pares homólogos para elaboração do cariótipo.

Em *M. ansatum* ($2n = 8$), a presença de dois cromossomos com sítio de DNAr 5S e dois com sítio de DNAr 45S, reforça a diploidia para o genoma com $2n = 8$ em *Mesosetum* e suporta sua formação a partir do número cromossômico básico $x = 4$. Estes resultados

contrastam com o obtido em *Zingeria trichopoda* ($2n = 8$), espécie em que foram encontrados quatro cromossomos com sítio de DNAr 5S e dois cromossomos com sítio de DNAr 45S, que confirmaram $2n = 8$ como nível tetraploide no gênero *Zingeria* (Kotseruba *et al.* 2003, 2005; Kim *et al.* 2009).

Em *M. compressum* ($2n = 16$), os quatro cromossomos com sítios de DNAr 5S e os dois cromossomos com sítio de DNAr 45 S evidenciaram a tetraploidia para $2n = 16$ em *Mesosetum*. Resultados semelhantes foram obtidos no alotetraploide *Zingeria trichopoda*, que embora tenha número cromossômico diferente ($2n = 8$), também apresentou quatro cromossomos com sítio de DNAr 5S e os 2 cromossomos com sítio de DNAr 45 S (Kotseruba *et al.* 2003; Kotseruba *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009). A principal diferença entre os tetraploides de *Mesosetum* e *Zingeria* é a posição dos sítios de DNAr nos cromossomos, sendo em *Mesosetum* um sítio de DNAr 5S sintênico ao sítio 45S em um par cromossômico e em *Zingeria* não há sintenia entre os sítios de DNAr 5S e 45S.

Em *M. compressum* os sítios de DNAr 45S parecem ter sido perdidos em um par cromossômico durante o curso da evolução, visto que seriam esperados quatro cromossomos com sítios de DNAr 45S no tetraploide após a duplicação do genoma. Resultados similares foram observados no alotetraploide *Z. trichopoda*, no qual também foi constatada perda do sítio de DNAr 45S em dois cromossomos (Kotseruba *et al.* 2003; Kotseruba *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009). Em *Z. trichopoda* a perda de DNA foi comprovada pela análise de marcadores ITS que mostraram a eliminação de seqüências de DNAr 45S na comparação com o diploide *Z. biebersteiniana*, o qual é o progenitor de metade do genoma de *Z. trichopoda* (Kotseruba *et al.* 2003; Kotseruba *et al.* 2005; Kim *et al.* 2009). Em *M. compressum* ainda não foi possível identificar se origem do genoma se é auto ou alotetraploide o que dificulta estabelecer se houve perda, translocação ou fusão de sítios de DNAr 45S ao longo da evolução.

Em *M. chaseae* ($2n = 24$) também foram encontrados cromossomos com sítios sintênicos de DNAr com 45S em posição mais proximal ao centrômero e 5S em posição mais distal ao centrômero. Estes cromossomos sintênicos com mesmas posições proximais e distais dos sítios de DNAr também foram encontrados em *M. compressum*, o que corrobora a filogenia de *Mesosetum*, na qual estas duas espécies formam um clado fortemente suportado (Silva dados não publicados).

Em *M. elytrochaetum* ($2n = 24$) o conjunto cromossômico representa quase perfeitamente 6 vezes o complemento genômico confirmando hexaploidia. Foram observados 6 cromossomos com 1 sítio de DNAr 5S e 6 cromossomos com sítio de DNAr 45S. Tendo em vista a ausência de espécie com nível hexaploide em $2n = 24$ caracterizada por FISH de DNAr 5S e 45S, os resultados foram comparados com espécies hexaploides de Poaceae com números cromossomos distintos.

No gênero *Avena* L., também foram encontrados 6 cromossomos com sítios de DNAr 45S nos hexaploides silvestres ($2n = 42$, $x = 7$) de *A. sativa* L. e *A. sterilis* L. (Tomás *et al.* 2016). Em *Zingeria*, no hexaploide *Z. kochii* (Mez) Tzvelev ($2n = 12$, $x = 2$) foram observados sítios de DNAr 5S também em seis cromossomos (Kotseruba *et al.* 2010). Já a presença de sítios de DNAr 45S em apenas 4 cromossomos é atribuída a perda de DNAr 45S durante a evolução do alohexaploide *Z. kochii* (Kotseruba *et al.* 2010).

Foram observadas diferenças entre os cariótipos das espécies com $2n = 24$, *M. chaseae* e *M. elytrochaetum*, as quais evidenciaram tendências evolutivas divergentes, embora estejam em um subclado altamente suportado e com morfologia bastante homogênea (Swallen 1937, Filgueiras 1986, 1989; Silva *et al.* 2015; Silva *et al.* 2016; Silva dados não publicados). Enquanto os sítios de DNAr 5S e 45S são sintênicos em dois cromossomos de *M. chaseae*, não foi observada sintenia de DNAr em nenhum cromossomo de *M. elytrochaetum*. Estas diferenças sugerem evolução a partir de linhagens distintas, ou ainda que houve perda ou

translocação de DNAr entre os cromossomos de *M. chaseae*. Uma maior perda de DNA já foi comprovada no genoma de *M. chaseae* ($2n = 24$) que apresenta $2C = 5,7903$ pg, o qual é quase 37% menor que o genoma de *M. elytrochaetum* ($2n = 24$) com $2C = 9,0172$ pg (Capítulo 2 desta tese).

3.5 Conclusão

Os resultados do presente capítulo corroboram a hipótese de evolução por poliploidia entre as espécies de *M. sect. Bifaria*, as quais estão incluídas no clado de *Mesosetum* com número cromossômico básico $x = 4$. O nível diploide é comprovadamente representado pelas espécies com $2n = 8$, a partir do qual evoluíram por poliploidia os níveis tetraploide ($2n = 4x = 16$) e hexaploide ($2n = 6x = 24$). As diferenças estruturais entre os cromossomos sugerem que após a poliploidização ocorreram mudanças no genoma ocasionadas por perda ou modificação do DNA. A presença e ausência de cromossomos com sintenia nos sítios de DNAr parece ser indicador de que surgiram distintas linhagens evolutivas em espécies de *Mesosetum* com $x = 4$.

A caracterização via citogenética molecular dos cromossomos de outras populações e espécies deve ser estimulada para ampliar o conhecimento acerca da evolução e origem do número cromossômico básico $x = 4$ no gênero *Mesosetum*.

3.6 Referências

- Amosova AV, Bolsheva NL, Samatadze TE, Twardovska MO, Zoshchuk SA, Andreev IO, Badaeva ED, Kunakh VA, Muravenko OV (2015) Molecular Cytogenetic Analysis of *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), Maritime Antarctic. PLoS ONE 10(9): 1-17
- Brasileiro-Vidal AC, Cuadrado A, Brammer SP, Zanatta ACA, Prestes AM, Moraes-Fernandes MIB, Guerra M (2003) Chromosome characterization in *Thinopyrum*

- ponticum* (Triticeae, Poaceae) using in situ hybridization with different DNA sequences. Genetics and Molecular Biology 26(4): 505-510
- Burke SV, Wysocki WP, Zuloaga FO, Craine JM, Pires JC, Edger PP, Mayfield-Jones D, Clark LG, Kelchner SA, Duvall MR (2016) Evolutionary relationships in Panicoid grasses based on plastome phylogenomics (Panicoideae; Poaceae). BMC Plant Biology 16(140): 1-11
- Celarier R, Paliwal R (1957) Basic chromosome number of four in the subfamily Panicoideae of the Gramineae. Science 126: 1247
- Cremonini R, Ruffini Castiglione M, Grif VG, Kotseruba VV, Punina EO, Rodionov AV, Muravenko OV, Popov KV, Samatadze TE, Zelenin AV (2003) Chromosome banding and DNA methylation patterns, chromatin organisation and nuclear DNA content in *Zingeria biebersteiniana*. Biologia Plantarum 46: 543-550
- Cremonini R (2005) Low chromosome number angiosperms. Caryologia 58(4): 403-409
- De Wet MJM (1987) Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) Grass systematics and evolution, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, pp 188-194
- Ferrari F (2010) Caracterização cromossômica em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., Poaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil
- Filgueiras TS (1986) O gênero *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brazil
- Filgueiras TS (1989) Revisão de *Mesosetum* Steudel (Gramineae: Paniceae). Acta Amazônica 19: 47-114
- Gerlach W, Bedbrook J (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic Acids Research 7: 1869-1885

- Harper JA, Thomas ID, Lovatt JA, Thomas HM (2004) Physical mapping of rDNA sites in possible diploid progenitors of polyploid *Festuca* species. . Plant Systematics and Evolution 245: 163-168
- Hilu K (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). Australian Journal of Botany 52: 13-22
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years. Genome 37: 717-725
- Kim ES, Bolsheva NL, Samatadze TE, Nosov NN, Nosova IV, Zelenin AV, Punina EO, Muravenko OV, Rodionov AV (2009) The unique genome of two-chromosome grasses *Zingeria* and *Colpodium*, its origin, and evolution. Russian Journal of Genetics 45 (11): 1329-1337
- Kotseruba VV, Gernand D, Meister A, Houben A (2003) Uniparental loss of ribosomal DNA in the allotetraploid grass *Zingeria tricopoda* ($2n = 8$). Genome 46: 156-163
- Kotseruba VV, Pistrick K, Gernand D, Meister A, Ghukasyan A, Gabrielyan I, Houben A (2005) Characterisation of the low-chromosome number grass *Colpodium versicolor* (Stev.) Schmalh. ($2n = 4$) by molecular cytogenetics. Caryologia 58(3): 241-245
- Kotseruba VV, Pistrick K, Blattner FR, Kumke K, Weiss O, Rutten T, Fuchs J, Endo T, Nasuda S, Ghukasyan A, Houben A (2010) The evolution of the hexaploid grass *Zingeria kochii* (Mez) Tzvel. ($2n = 12$) was accompanied by complex hybridization. Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 146-155
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome Size Dynamics and Evolution in Monocots. Journal of Botany 186: 1-18
- Michelan TS, Trevisan R, Silva CRMd, Souza RFd, Luceño M, Vanzela ALL (2012) Morphological and genomic characterization of *Rhynchospora tenuis* complex (Cyperaceae) and its taxonomic implications. Rodriguésia 63(4): 1-10

- Morrone O, Aagesen L, Scataglini MA, Salariato DL, Denham SS, Chemisquy MA, Sede SM, Giussani LM, Kellogg EA, Zuloaga FO (2012) Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. *Cladistics* 28: 333-356
- Murat F, Xu J-H, Tannier E, Abrouk M, Guilhot N, Pont C, Messing J, Salse J (2010) Ancestral grass karyotype reconstruction unravels new mechanisms of genome shuffling as a source of plant evolution. *Genome Research* 20: 1545-1557
- Nielen S, Almeida LM, Carneiro VTC, Araujo ACG (2010) Physical mapping of rDNA genes corroborates allopolyploid origin in apomictic *Brachiaria brizantha*. *Sexual Plant Reproduction* 23: 45-51
- Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal Map of the Model Legume *Lotus japonicus*. *Genetics* 161(1661-1672):
- Rao Y (1975) Evolutionary trends in the Indian Iseilema. *Nature* 255: 220-221
- Ribeiro ARO (2013) Citogenética, reprodução e variabilidade morfológica de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase (Poaceae: Paniceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Ribeiro ARO, Sousa MWS, Oliveira RC, Araujo ACG, Fagg CW, Pozzobon MT (2015) Cytological studies in four species of *Mesosetum* (Arthropogoninae) reveal the lowest chromosome number among the Neotropical Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301(10): 2377-2386
- Ruban A, Fuchs J, Marques A, Schubert V, Soloviev A, Raskina O, Badaeva E, Houben A (2014) B Chromosomes of *Aegilops speltoides* Are Enriched in Organelle Genome-Derived Sequences. *Plos One* 9(2): e90214
- Sang Y, Liang GH (2000) Comparative physical mapping of the 18S-5.8S-26S rDNA in three *Sorghum* species. *Genome* 43: 22-28

- Santos CAG (2007) Revisão de *Axonopus* serie *Suffulti* G.A. Black (Poaceae: Paniceae) para o Brasil. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil
- Shishido R, Sano Y, Fukui K (2000) Ribosomal DNAs: an exception to the conservation of gene order in rice genomes. *Molecular and General Genetics* 263: 586-591
- Silva AS, Ribeiro ARO, Sousa MWS, Fagg CW, Falcão R, Oliveira RC (2015) Micromorphology of the upper antheridium in *Mesosetum* Steud. and related genera (Poaceae, Arthropogoninae) and its taxonomic applications. *Rodriguésia* 66(2): 645-657
- Silva AS, Villarroel D, Ribeiro ARO, Oliveira RC (2016) Eleven new records of little known taxa of *Mesosetum* and *Paspalum* (Poaceae) from Brazil and Bolivia. *Phytotaxa* 268(1): 069-079
- Silva AS (dados não publicados) Filogenia de *Mesosetum* Steud. (Paspaleae: Poaceae) com base caracteres moleculares. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Simon L, Voisin M, Tatout C, Probst AV (2015) Structure and Function of Centromeric and Pericentromeric Heterochromatin in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 6: Article 1049
- Sousa MWS (2014) Citogenética e morfologia de espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae, Paspaleae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Souza LGR, Crosa O, Winge H, Guerra M (2009) The karyotype of *Nothoscordum arenarium* Herter (Gilliesioideae, Alliaceae): A populational and cytomolecular analysis. *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 111-116
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M (2012) Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* 109: 987-999

- Studer AJ, Schnable JC, Weissmann S, Kolbe AR, McKain MR, Shao Y, Cousins AB, Kellogg EA, Brutnell TP (2016) The draft genome of the C3 panicoid grass species *Dichanthelium oligosanthes*. *Genome Biology* 17(223): 1-18
- Swallen JR (1937) The grass genus *Mesosetum*. *Brittonia* 2(4): 363-392
- Tomás D, Rodrigues J, Varela A, Veloso MM, Viegas W, Silva M (2016) Use of Repetitive Sequences for Molecular and Cytogenetic Characterization of *Avena* Species from Portugal. *International Journal of Molecular Sciences* 17(203): 1-14
- Vaio M, Speranza P, Valls JFM, Guerra M, Mazzella C (2005) Localization of the 5S and 45S rDNA Sites and cpDNA Sequence Analysis in Species of the Quadrifaria Group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany* 96: 191-200

CAPÍTULO 4

Estudos de viabilidade polínica em espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae: Paspaleae)

4.1 Introdução

A poliploidia tem sido um dos eventos mais importantes na evolução das espécies de Poaceae, sendo registrada em pelo menos 80% de suas espécies e estritamente relacionada com a meiose e gametogênese (De Wet 1987, Hunziker & Stebbins 1987, Hilu 2004, Ortiz *et al.* 2013, Pozzobon *et al.* 2013).

Embora os poliploides instáveis normalmente exibam altas taxas de irregularidades no pareamento e segregação dos cromossomos, algumas de suas células reprodutivas executam divisão meiótica regular (De Wet 1987; Savidan *et al.* 2001; Paterson *et al.* 2004; Pagliarini & Pozzobon 2005; Boldrini 2009; Eilam *et al.* 2010; Ortiz *et al.* 2013; Pozzobon *et al.* 2013; Bernardo Filho *et al.* 2014). Pela consolidação destas divisões regulares e estabilização da meiose, genomas poliploides tornam-se diploidizados gradualmente ao longo das gerações, exibindo pareamento em bivalentes, segregação normal e gametas balanceados, viabilizando a formação de sementes férteis que irão garantir a permanência de futuras gerações (Nogler 1984, De Wet 1987, Savidan *et al.* 2001, Paterson *et al.* 2004, Boldrini 2009, Eilam *et al.* 2010). Esta tendência de diploidização tem sido confirmada em Paniceae *s.l.* (Sede *et al.* 2010).

No gênero *Mesosetum* Steud., os estudos citogenéticos tem confirmado a ocorrência de poliploidia durante sua evolução (Gould 1966; Gould & Soderstrom 1967; Pohl & Davidse 1971 Davidse & Pohl 1972, Silva *et al.* 2012; Ribeiro 2013, Sousa 2014; Ribeiro *et al.* (2015). Um primeiro grupo de espécies com $2n = 20$ e 60 cromossomos tem série poliploide que evoluiu a partir de $x = 10$, que é provavelmente mais basal em *Mesosetum*. Um segundo grupo de espécies com $2n = 8, 16, 24$ e 32 cromossomos tem série poliploide que evoluiu a partir $x = 4$ (Ribeiro 2013; Sousa 2014; Ribeiro *et al.* 2015; Silva dados não publicados; Capítulos 1, 2 e 3 desta tese de doutorado).

Os resultados de Ribeiro (2013) mostraram a ocorrência de estabilidade meiótica no nível tetraploide ($2n = 16$) em *M. bifarium* e no nível hexaploide em *M. elytrochaetum* ($2n = 24$) com predomínio de bivalentes no pareamento e segregação balanceada e raros quadrivalentes e micronúcleos. Entretanto, para o hexaploide de *M. chaseae* ($2n = 24$), Ribeiro (2013) observou alta instabilidade da meiose com predomínio de aderências e associações múltiplas no pareamento e tétrades com alta frequência de micronúcleos.

Apesar do avanço no conhecimento sobre a meiose das espécies de *Mesosetum* feito nos trabalhos de Silva *et al.* (2012), Ribeiro (2013), Sousa (2014) e Ribeiro *et al.* (2015), são escassos os estudos reprodutivos no gênero. Embora já haja conhecimento do Índice Meiótico - IM (Love 1949) para 10 espécies de *Mesosetum*, o único trabalho contemplando a viabilidade polínica foi o de Silva *et al.* (2012) que avaliou a fertilidade do pólen em dez acessos de *M. chaseae* Luces. Esta carência de estudos não permite inferir se a estabilização da meiose interferiu na fertilidade do pólen das espécies de *Mesosetum*, como em outros gêneros de Paniceae *s.l* (Techio *et al.* 2006; Felismino *et al.* 2011; Bernado Filho *et al.* 2014).

Desse modo, os objetivos deste trabalho foram examinar a viabilidade polínica e índice meiótico em espécies de *Mesosetum* de forma a complementar as informações já disponíveis na literatura e investigar a interferência da estabilidade na viabilidade polínica e como atuaram na evolução das espécies de *Mesosetum*.

4.2 Material e Métodos

As flores para análise da viabilidade polínica e índice meiótico foram obtidas de mudas de acessos provenientes de touceiras coletadas em expedições de campo nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e Pernambuco. Os *vouchers* foram depositados no herbário da Universidade de Brasília, UB (acrônimo disponível em Thiers 2016). O cultivo das mudas foi conduzido na Casa de Vegetação da Fitopatologia, Universidade de Brasília.

Para a viabilidade polínica foram analisados oito acessos incluindo sete espécies de *Mesosetum* (Tabela 1), com pelo menos 5000 pólenes analisados de cada acesso, com pelo menos 1000 grãos analisados por flor. As técnicas utilizadas foram baseadas nas descritas por Pozzobon *et al.* (2011). As lâminas foram preparadas com anteras provenientes de flores imediatamente após a antese e a coloração foi feita com carmim-acético 2%.

Tabela 1. Discriminação das espécies e acessos de *Mesosetum* com viabilidade polínica avaliada

Espécie	Acesso	Nº Crom.	Local de Coleta
<i>Mesosetum alatum</i> Filg.	RCO 2765	2n = 8	Brasil, Mato Grosso, Água Boa
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlmann.	RCO 2766	2n = 8	Brasil, Mato Grosso, Poconé
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlmann.	RCO 2784	2n = 8	Brasil, Mato Grosso, Chapada dos Guimarães
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	ASS 235	2n = 16	Brasil, Goiás, Teresina de Goiás
<i>Mesosetum chaseae</i> Luces	RCO 2772	2n = 24	Brasil, Mato Grosso, Poconé
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	Brasil, Pernambuco, Pesqueira
<i>Mesosetum elytrochaetum</i> (Hack.) Swallen	RCO 2722	2n = 24	Brasil, Goiás, Alto Paraíso
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331	2n = 20	Brasil, Minas Gerais, Grão Mogol

A análise foi feita, através da classificação visual dos grãos, os quais foram contabilizados e identificados em diferentes tipos, sendo os grãos de pólen vazios, mal corados ou mal formados considerados inviáveis. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio LEICA, do Laboratório de Criptógamas, Departamento de Botânica da UnB.

Para análise do índice meiótico as técnicas se basearam em Ribeiro *et al.* (2015). As inflorescências coletadas no campo ou a partir do florescimento das mudas cultivadas, foram fixadas e armazenadas a 4°C em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético, v/v). A coloração foi feita com carmim-acético 2%. Foram examinadas pelo menos 200 tétrades por acesso para determinação do Índice Meiótico proposto por Love (1949).

4.3 Resultados

Os acessos avaliados apresentaram, em geral, altos percentuais de pólen viáveis (Tabela 2, Figura 1), sendo de 82,18% em *M. alatum*, 98,77% em *M. ansatum* (média dos dois acessos), 73,90% em *M. bifarium*, 91,70% em *M. compressum*, 93,21% em *M. elytrochaetum* e 95,05% em *M. rottboellioides*.

Para a espécie *M. chaseae*, obteve-se uma baixa taxa de viabilidade, apresentando apenas 27,69% de grãos viáveis. Dentro dos grãos de pólen inviáveis, a grande maioria, com 6.610 grãos contabilizados, foi de grãos vazios, porém também foram observados grãos de pólen mal corados e mal formados (1 F-H). Alguns grãos de pólen apresentaram visualmente diferenças no tamanho (Figura 1 E).

Tabela 2. Viabilidade polínica e Índice Meiótico em espécies de *Mesosetum*

Espécie	Acesso	Nº Crom.	Viabil. Polínica	Índice Meiótico
<i>Mesosetum alatum</i> Filg.	RCO 2765	2n = 8	82,18%	X
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlm.	RCO 2766	2n = 8	98,18%	96,49% (Ribeiro <i>et al.</i> 2015)
<i>Mesosetum ansatum</i> (Trin.) Kuhlm.	RCO 2784	2n = 8	99,16%	99,03% (presente estudo)
<i>Mesosetum bifarium</i> (Hack.) Chase	ASS 235	2n = 16	73,90%	90,82% (Ribeiro 2013)
<i>Mesosetum chaseae</i> Luces	RCO 2772	2n = 24	27,69%	22,22% (Ribeiro 2013)
<i>Mesosetum compressum</i> Swallen	ASS 274	2n = 16	91,70%	96,70% (presente estudo)
<i>Mesosetum elytrochaetum</i> (Hack.) Swallen	RCO 2722	2n = 24	93,21%	75,93% (Ribeiro 2013)
<i>Mesosetum rottboellioides</i> (Kunth) Hitchc.	PAR 331	2n = 20	95,05%	100,00% (Sousa 2014)

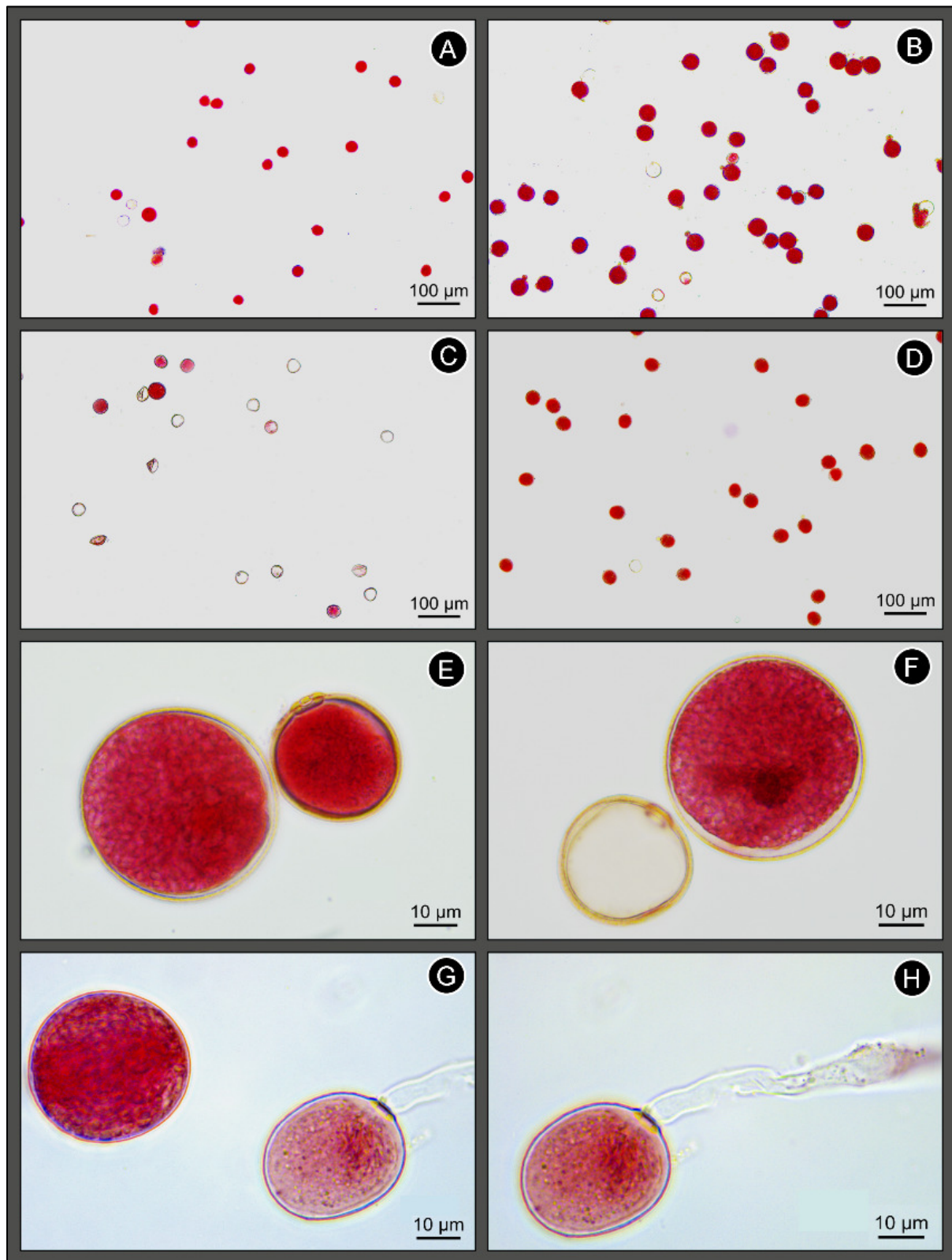


Figura 1. Grãos de pólen corados com carmalum acético em espécies de *Mesosetum*. **A-D.** Vista geral da viabilidade dos grãos de pólen. **A.** *M. alatum*, RCO 2765. **B.** *M. bifarium*, ASS 235. **C.** *M. chaseae*, RCO 2772. **D.** *M. rottboellioides*, PAR 331. **E-F.** Detalhe de grãos de pólen de *M. bifarium*, ASS 235. **E.** Grãos de pólen bem corados com distintos tamanhos. **F.** Grão de pólen vazio ao lado de viável. **G-H.** Detalhe dos grãos de pólen de *M. rottboellioides*, PAR 331. **G.** Grão de pólen mal corado ao lado de viável. **H.** Grão de pólen mal corado germinando.

4.4 Discussão

A viabilidade polínica relacionou-se diretamente com o índice meiótico (Tabela 2), sendo alta nos acessos com índices meióticos altos e baixa no acesso com índice meiótico baixo. De acordo com Pagliarini & Pozzobon (2005) plantas com meiose instável têm como consequência uma baixa taxa de grãos de pólen viáveis devido a anormalidades no pareamento e segregação dos cromossomos.

Para as espécies *M. ansatum*, *M. bifarium*, *M. compressum*, *M. elytrochaetum*, *M. rottboellioides*, foram observadas taxas de viabilidade polínica acima de 70%, corroborando a estabilidade meiótica observada pelos trabalhos de Ribeiro (2013), Sousa (2014) e Ribeiro *et al.* (2015).

A baixa viabilidade polínica (27,69%) do acesso investigado de *M. chaseae* (RCO 2772, $2n = 24$), corrobora as análises de Ribeiro (2013) para este mesmo acesso, no qual foi observada uma taxa de irregularidade muito alta, sendo encontradas anormalidades meióticas em todas as fases.

Resultados diferentes foram observados por Silva *et al.* (2012), que observaram número cromossômico $2n = 16$, meiose estável e alta viabilidade polínica em análise de distintas populações de *M. chaseae* provenientes do estado de Mato Grosso do Sul. A variação da viabilidade polínica entre 60% e 90% nos distintos acessos observados por Silva *et al.* (2012) foi atribuída a fatores ambientais. Silva *et al.* (2012) classificou a viabilidade polínica como alta, mesmo nos acessos com fertilidade em torno de 60%, visto que houve compensação pelo grande número de grãos de pólen produzidos em cada flor.

Alguns grãos de pólen encontrados tiveram tamanhos desuniformes (Figura 1E). Normalmente, a presença de grãos de pólen maiores pode estar indicando, eventualmente, gametas não reduzidos ou, pelo menos gametas com número de cromossomos diferentes (Techio *et al.* 2006; Reis *et al.* 2008; Pozzobon *et al.* 2011; Bernardo Filho *et al.* 2014).

4.5 Conclusão

Os resultados encontrados confirmam também em *Mesosetum* a relação direta entre o comportamento meiótico e a viabilidade polínica observada em *Panicum* L., *Paspalum* L. e *Urochloa* P. Beauv. (Valle & Savidan 1996, Savidan *et al.* 2001, Hojsgaard *et al.* 2009, Ma *et al.* 2009, Ortiz *et al.* 2013, Hojsgaard *et al.* 2014). A alta viabilidade observada mesmo em poliploides indica que a estabilização da meiose tem contribuído para o restabelecimento da fertilidade do pólen. Novos estudos reprodutivos serão essenciais para confirmar a ocorrência deste padrão evolutivo nas demais espécies de *Mesosetum*.

4.6 Referências

- Bernardo Filho RA, Santos AC, Souza FH, Valls JFM, Pagliarini MS (2014) Complete asynapsis resulting in 2n pollen formation in *Paspalum jesuiticum* Parodi (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 13(1): 255-261
- Boldrini KR, Pagliarini MS, Valle CB (2009) Meiotic behavior of a nonaploid accession endorses $x = 6$ for *Brachiaria humidicola* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 8(4): 1444-1450
- Davidse G, Pohl RW (1972) Chromosome numbers, meiotic behavior, and notes on some grasses from Central America and the West Indies. *Canadian Journal of Botany* 50: 1441-1452
- De Wet MJM (1987) Hybridization and polyploidy in the Poaceae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass systematics and evolution*, Smithsonian Inst. Press., Washington DC, pp 188-194
- Eilam T, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M (2010) Genome Size in Diploids, Allopolyploids, and Autopolyploids of Mediterranean Triticeae. *Journal of Botany* 2010: 1-12

- Felismino MF, Pagliarini MS, Valle CB, Resende RMS (2011) Meiotic stability in two valuable interspecific hybrids of *Brachiaria* (Poaceae). *Plant Breeding* 131: 402-408
- Gould FW (1966) Chromosome numbers of some Mexican grasses. *Canadian Journal of Botany* 44: 1683-1696
- Gould FW, Soderstrom TR (1967) Chromosome numbers of tropical American grasses. *American Journal of Botany* 54: 676-683
- Hilu K (2004) Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52: 13-22
- Hojsgaard D, Honfi AI, Rua G, Daviña J (2009) Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from subtropical South America (Poaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 533-545
- Hojsgaard D, Klatt S, Baier R, Carman JG, Hörandl E (2014) Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33(5): 414-427
- Hunziker JH, Stebbins GL (1987) Chromosome evolution in the Gramineae. In: Soderstrom TR, Hilu KW, Campbell CS, Barkworth MA (eds.) *Grass Systematics and Evolution*, Smithsonian Inst., Washington, pp 179-187
- Love RA (1949) Estudos Citológicos Preliminares de Trigos Riograndenses. vol. Circular n° 74. Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS
- Ma GH, Huang XL, Xu QS, Eric B (2009) Multiporate pollen and apomixis in Panicoideae. *Pakistan Journal of Botany* 41(5): 2073-2082
- Nogler GA (1984) Gametophytic apomixis. In: Johri BM (ed.) *Embriology of Angiosperms*, Springer-Verlag, Berlin, pp 475-518

- Ortiz JPA, Quarin CL, Pessino SC, Acuña C, Martínez EJ, Espinoza F, Hojsgaard DH, Sartor ME, Cáceres ME, Pupilli F (2013) Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. *Annals of Botany* 112: 767-787
- Pagliarini MS, Pozzobon MT (2005) Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: Peñaloza APS (coord.) Curso de Citogenética aplicada a Recursos Genéticos Vegetais, vol. Documentos 154 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, pp 24-41
- Paterson AH, Bowers JE, Chapman BA (2004) Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(26): 9903-9908
- Pohl RW, Davidse G (1971) Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia* 23: 293-324
- Pozzobon MT, Valls JFM (1997) Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). *Brazilian Journal of Genetics* 20: 29-34
- Pozzobon MT, Souza KRR, Carvalho SIC, Reifschneider FJB (2011) Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. *Horticultura Brasileira* 29: 212-216
- Pozzobon MT, Paganella MB, Santos S, Valls JFM (2013) Cytological and reproductive aspects in the Caespitosa group of *Paspalum*. *Ciência Rural* 43(11): 2004-2010
- Reis CAO, Schifino-Wittmann MT, Dall'Agnol M (2008) Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 8: 212-218
- Ribeiro ARO (2013) Citogenética, reprodução e variabilidade morfológica de espécies de *Mesosetum* sect. *Bifaria* (Hack.) Chase (Poaceae: Paniceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

- Ribeiro ARO, Sousa MWS, Oliveira RC, Araujo ACG, Fagg CW, Pozzobon MT (2015) Cytological studies in four species of *Mesosetum* (Arthropogoninae) reveal the lowest chromosome number among the Neotropical Poaceae. *Plant Systematics and Evolution* 301(10): 2377-2386
- Savidan Y, Carman JG, Dresselhaus T (eds.) (2001) *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. CIMMYT, IRD, European Commission OC VI (FAIR), México-DF
- Sede S, Escobar A, Morrone O, Zuloaga FO (2010) Chromosome studies in American Paniceae (Poaceae-Panicoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 128-138
- Silva AS (dados não publicados) Filogenia de *Mesosetum* Steud. (Paspaleae: Poaceae) com base caracteres moleculares. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Silva LAC, Pagliarini MS, Santos SA, Silva N, Souza VF (2012) Chromosome number, microsporogenesis, microgametogenesis, and pollen viability in the Brazilian native grass *Mesosetum chaseae* (Poaceae). *Genetics and Molecular Research* 11(4): 4100-4109
- Sousa MWS (2014) Citogenética e morfologia de espécies de *Mesosetum* Steud. (Poaceae, Paspaleae). Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil
- Techio VH, Davide LC, Pedrozo CÂ, Pereira AV (2006) Viabilidade do grão de pólen de acessos de capim-elefante, milho e híbridos interespecíficos (capim-elefante x milho). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 28(1): 7-12
- Thiers B (2016) *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at: <http://sweetgum.nybg.org/ih/>, Accessed 02 Feb. 2016

Valle CB, Savidan Y (1996) Genetics, cytogenetics, and reproductive biology of *Brachiaria*.

In: Miles JW, Maass BL, Valle CB (eds.) *Brachiaria: biology, agronomy and improvement* Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Cali, Colombia, pp 147-163

CONCLUSÕES GERAIS DA TESE

- 1) A evolução por meio de mudanças em ordem cromossômica originou pelo menos três linhagens em *Mesosetum* correspondentes aos números básicos $x = 4$, $x = 10$ e $x = 13$, suportando os dados propostos pela filogenia molecular elaborada para o gênero.
- 2) As espécies de *Mesosetum* com número cromossômico básico $x = 10$ são provavelmente mais basais e compartilham genoma pequeno como observado em outros gêneros também pertencentes à tribo Paspaleae.
- 3) O clado $x = 10$ parece ter mantido o conjunto cromossômico mais conservado e semelhante ao ancestral de *Mesosetum*.
- 4) O clado $x = 4$ e a linhagem monoespecífica com $x = 13$, derivados a partir de $x = 10$, seguiram rotas de evolução cromossômica divergentes, a primeira ($x = 4$) por redução e a segunda ($x = 13$) por aumento do número cromossômico.
- 5) A origem do número cromossômico $x = 4$ por meio de um evento de redução abrupto a partir de $x = 10$ é pouco provável, pois implicaria na perda de seis pares cromossômicos, os quais correspondem a mais da metade do complemento genômico original com 10 cromossomos. É mais provável que esta redução tenha sido gradual e ocorrido por rearranjos ou fusão de cromossomos numa série de eventos que originaram números cromossômicos intermediários entre $x = 4$ e $x = 10$, assim como em outros gêneros de Panicoideae e Pooideae.
- 6) Os dados de citometria de fluxo sugerem que houve ganho de DNA nas espécies de *Mesosetum* do clado $x = 4$ após sua origem a partir de cariótipo ancestral com cromossomos menores.
- 7) Esta expansão do tamanho do genoma refletiu no aumento do tamanho cromossômico nas espécies do clado $x = 4$

8) Os resultados com FISH corroboram a hipótese de evolução por poliploidia entre as espécies de *M. sect. Bifaria*, as quais estão incluídas no clado de *Mesosetum* com número cromossômico básico $x = 4$. O nível diploide é representado pelas espécies com $2n = 8$, partir do qual evoluíram por poliploidia os níveis tetraploide ($2n = 4x = 16$) e hexaploide ($2n = 6x = 24$). As diferenças estruturais entre os cromossomos sugerem que após a poliploidização ocorreram mudanças no genoma ocasionadas por perda ou modificação do DNA. A presença e ausência de cromossomos com sintenia nos sítios de DNAr parece ser indicador de que surgiram distintas linhagens evolutivas em espécies de *Mesosetum* com $x = 4$. A alta viabilidade polínica observada mesmo em poliploides indica que a estabilização da meiose tem contribuído para o restabelecimento da fertilidade do pólen.

9) A origem de $x = 13$ em *Mesosetum* pode ser relacionada a eventos de fissão ou duplicação de cromossomos a partir de um cariótipo original com $x = 10$. Estudos citogenéticos em novas populações de *M. exaratum* e espécies relacionadas morfologicamente devem ser estimulados para elucidar a origem de $x = 13$ em *Mesosetum*.

10) A ampliação dos estudos envolvendo contagens cromossômicas e caracterização citogenética avançada deve ser encorajada para investigar como surgiram os números cromossômicos raros, $x = 4$ e $x = 13$, encontrados em *Mesosetum*. A caracterização citogenética de outros gêneros e espécies de Arthropogoninae e Paspaleae também deve ser conduzida, tendo em vista que auxiliará e complementar o conhecimento acerca da evolução cromossômica em *Mesosetum*. Deve haver um enfoque especial nas espécies com distribuição geográfica restrita, com poucos registros de herbário e florescimento estimulado pelo fogo, fatores que tem dificultado sua localização e, portanto, sua caracterização citogenética. Estes fatores contribuem para que estas espécies permaneçam até hoje com número cromossômico desconhecido.