

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Citogenética do complexo *Eriochrysis cayennensis* – *E. villosa*
(Poaceae: Andropogoneae)**

Trabalho de Conclusão de Curso

Luana Crestani de Carvalho

Porto Alegre, junho de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Luana Crestani de Carvalho

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre, julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a essa força superior que rege o universo sem nunca nos encarregar de uma tarefa que não consigamos cumprir, que fala em nosso ouvido que somos capazes de realizar o que quisermos e mostra que sempre há uma saída mesmo na noite mais escura.

À universidade e ao programa PRAE por tornarem possível a realização do primeiro passo do meu sonho.

Aos meus pais por me presentarem com sua força, determinação e sapiência que me conduziram chegar até aqui. Vocês me motivam todos os dias, de verdade. Amo vocês.

Ao meu namorado por não me deixar pirar sozinha, ser o melhor *chef de cuisine*/psicólogo/massagista/amigo/cabelereiro que eu poderia ter e por sempre me amar e cuidar de mim até quando nem eu queria fazer isso por mim mesma.

À minha orientadora, Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, por me aceitar como orientada, confiar no meu potencial e investir nele. Receber a tua orientação me fez ter mais certeza de que estou trilhando o caminho certo e espero um dia poder orientar outros como tu me orientaste.

À Dra. Marion Schiengold, minha mais autêntica e sincera incentivadora. Obrigada por transpor a barreira aluno-professor de uma maneira tão encantadora e me inspirar de uma forma tão profunda.

Aos amigos que fiz na faculdade. Vocês tornaram essa caminhada mais suave e enriquecedora, de todas as formas. Todo sofrimento, quando ao lado dos amigos, se torna mais brando. À Guardiola, em especial, pois de todos é a que mais me entende. Tu estás no meu coração.

Por fim, a mim mesma por ter prestado atenção naquela voz em meu ouvido e por ter sido capaz de reconhecer minhas limitações e pedir auxílio quando precisei.

SUMÁRIO

RESUMO	5
INTRODUÇÃO GERAL	7
1. Família Poaceae	7
2. Tribo Andropogoneae	8
3. Gênero <i>Eriochrysis</i> P. Beauv.	8
4. Estudos citogenéticos	13
JUSTIFICATIVA	15
OBJETIVO GERAL	16
Objetivos específicos	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Coleta do material vegetal	17
2. Análises citogenéticas	17
2.1. Análises meióticas	17
2.2. Viabilidade e morfologia do pólen	19
2.3. Análise de tamanho de genoma	19
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

Eriochrysis é um gênero de gramínea que pertence à tribo Andropogoneae e possui ca. 7–12 espécies, tendo sua distribuição principal em regiões tropicais da América, África e Índia. Dentro do gênero, a delimitação das espécies é bastante controversa em virtude dos poucos caracteres morfológicos capazes de uma diferenciação clara, bem como da existência de morfotipos intermediários. O “complexo *Eriochrysis cayennensis* – *E. villosa*” retrata essa situação.

Em uma região de simpatria das espécies *E. cayennensis*, *E. villosa* e *E. laxa* num banhado em São Borja/RS, foram encontrados indivíduos de morfologia intermediária, os quais por análises moleculares foram definidos como híbridos naturais entre *E. laxa* e *E. villosa*, possivelmente poliploides e identificados como *Eriochrysis* aff. *laxa*.

O presente estudo teve por objetivos determinar o número cromossômico, analisar o comportamento meiótico, determinar a viabilidade e a morfologia dos grãos de pólen, assim como estimar o tamanho de genoma de *E. cayennensis*, *E. laxa*, *E. villosa* e *Eriochrysis* aff. *laxa*, visando caracterizá-los citogeneticamente e investigar a condição híbrida.

Inflorescências jovens de cada um dos taxa foram coletadas para as análises meióticas realizadas por esmagamento das anteras em carmim propiônico 2%. Inflorescências próximas à antese foram fixadas para as análises de viabilidade e morfologia dos grãos de pólen mediante o método de Alexander. Estimou-se também a quantidade de DNA através de análises de citometria de fluxo utilizando amostras de folhas frescas.

Todos os taxa analisados apresentaram $2n = 2x = 20$, corroborando dados da literatura para *E. cayennensis* e *E. laxa* e trazendo registro inédito para *E. villosa*, mantendo o número básico $x = 10$ para o gênero. As análises citogenéticas evidenciaram claramente que todas as espécies, incluindo os putativos híbridos, são diploides. Não foram encontradas séries poliploides ou citótipos variantes.

As três espécies e o possível híbrido mostraram alta regularidade meiótica (mais de 99% de meiócitos normais) e 100% dos pólenes viáveis, indicando espécies já estabelecidas. Todos os taxa possuem pólen prolado esferoidal, inclusive o putativo híbrido.

Os valores 2C para tamanho de genoma foram de 3,33 pg para *E. cayennensis*, 3,42 pg para *E. laxa*, 3,46 pg para *E. villosa* e 3,41 pg para *Eriochrysis* aff. *laxa*.

A alta regularidade nos supostos híbridos e o número cromossômico diploide não seriam esperados para plantas originadas de alopoloidização, como sugerido previamente pelos dados moleculares.

Embora o status híbrido não possa ser totalmente descartado a partir das análises citogenéticas realizadas até o momento, a condição poliploide não foi confirmada em nenhum dos indivíduos de morfologia intermediária analisados neste estudo. Análises citogenéticas complementares utilizando técnicas como GISH e FISH são necessárias para esclarecer se esses indivíduos analisados poderiam ser híbridos, porém homoploides, ou apenas representantes da plasticidade fenotípica das espécies analisadas.

Palavras-chave: *Eriochrysis*, hibridação, citogenética, número cromossômico, regularidade meiótica.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Família Poaceae

Integrante da ordem Poales (APG II, 2003) do clado das monocotiledôneas, a família Poaceae é tida como uma das maiores famílias de plantas vasculares (Thomasson, 1987). Esta família ocupa uma grande variedade de habitats (Clayton e Renvoize, 1986; Osborne *et al.* 2011) e é o principal componente dos campos, diminuindo sua ocorrência nas formações florestais (Welker e Longhi-Wagner, 2007).

Devido à sua dominância em diversos ecossistemas terrestres e ao seu envolvimento direto e indireto na alimentação humana, a família possui grande importância ecológica e econômica (Boldrini *et al.*, 2008), incluindo as quatro espécies mais cultivadas em todo o mundo: trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (Rúgolo de Agrasar e Puglia, 2004).

Com distribuição cosmopolita, Poaceae possui 768 gêneros, aproximadamente 11.500 espécies e é dividida em 12 subfamílias: Anomochlooideae, Aristidoideae, Arundinoideae, Bambusoideae, Chloridoideae, Danthonioideae, Micraioideae, Oryzoideae, Panicoideae, Pharoideae, Puelioideae e Pooideae (Soreng *et al.*, 2017). Análises filogenéticas mais recentes indicam Panicoideae subdividida em 13 tribos: Paspal, Lecomtelleae, Gynerieae, Cyperochloae, Thysanolaeneae, Centotheceae, Trsitachyideae, Zeugitae, Chasmantieae, Steyermarkochloae, Paniceae, Arundinelleae e Andropogoneae (Soreng *et al.*, 2017).

Das subfamílias de Poaceae, apenas Puelioideae não possui representantes no Brasil. Contudo, esta família conta com 224 gêneros e 1482 espécies distribuídas principalmente na Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia, sendo o Rio Grande do Sul o terceiro maior estado em número de espécies (Filgueiras *et al.*, 2015).

2. Tribo Andropogoneae

A tribo Andropogoneae pertence à subfamília Panicoideae, ocupa regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo com mais de 1.200 espécies, cerca de 90 gêneros e 11 subtribos, além de ser fortemente suportada como monofilética (Clayton e Renvoize, 1986; GPWG 2001; Chen *et al.*, 2006; Simon, 2007; Kellogg, 2015). Uma das subtribos de Andropogoneae é Saccharinae, que possui cerca de 140 espécies em 13 gêneros, entre eles *Eriochrysis* P. Beauv. (Clayton e Renvoize, 1986).

A tribo é constituída grandemente por espécies perenes, com hábito cespitoso e ciclo de vida estival. Suas inflorescências albo-plumosas sobressaem-se no campo. Nos campos do sul do Brasil estão presentes como importantes componentes de pastagens naturais (Hervé e Valls, 1980) e no cerrado aparecem em vegetação baixa e algumas espécies fazem parte de pastagens cultivadas (Allem e Valls, 1987).

3. Gênero *Eriochrysis* P. Beauv.

Eriochrysis é um gênero típico de banhados e campos úmidos, com cerca de 7–12 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais da América, com algumas espécies também na África e na Índia (Clayton e Renvoize, 1986; Kellogg, 2015; The Plant List, 2016; Watson e Dallwitz, 1992). Destas, seis são citadas para o Brasil: *Eriochrysis cayennensis* P. Beauv., *E. filiformis* (Hack.) Filg., *E. holcoides* (Nees) Kuhl., *E. laxa* Swallen, *E. villosa* Swallen e *E. warmingiana* (Hack.) Kuhl. (Filgueiras e Welker, 2012). Este gênero é caracterizado principalmente pelas inflorescências alongadas com tricomas de cor marrom-dourado a marrom-claro e espiguetas heterógamas em pares nos ramos da inflorescência; cada par inclui uma espigueta séssil com uma flor bissexual e uma espigueta pedicelada com uma flor pistilada (Welker e Longhi-Wagner, 2012).

Dentre as espécies referidas para o Brasil, Welker *et al.* (2012) encontraram co-ocorrendo em um mesmo banhado as espécies *E. cayennensis*, *E. laxa*, *E. villosa* e também indivíduos de morfologia intermediária denominados *Eriochrysis* aff. *laxa*. Esses taxa são descritos abaixo e são alvo deste estudo.

Eriochrysis cayennensis

Segundo Welker e Longhi-Wagner (2012), as plantas de *E. cayennensis* possuem de 30 a 180 cm de altura, bainhas foliares glabras ou glabrescentes, menos comumente vilosas perto do ápice, lâminas glabras ou glabrescentes, menos comumente vilosas em ambas as superfícies, com densos tufo de tricomas na base da superfície adaxial, atrás da lígula (Figura 1A e D). A inflorescência é contraída, de 5 a 23 cm de comprimento, densamente pilosa, com as espiguetas praticamente escondidas entre os tricomas de cor marrom-dourada, com espiguetas pediceladas de 1,5 a 2,2 mm de comprimento e cariopse medindo de 0,7 a 1 mm.

E. cayennensis é encontrada desde os EUA até Argentina e Brasil, ocorrendo em todo território brasileiro. É a espécie mais comum do gênero no Rio Grande do Sul, estando presente na maioria das regiões fisiográficas, em pântanos e campos úmidos. São encontradas com flores e frutos principalmente de setembro a abril (Welker e Longhi-Wagner, 2012).

Eriochrysis laxa

Perenes e cespitosos, os indivíduos dessa espécie medem de 125 a 215 cm de altura, apresentam nós pilosos, bainhas foliares glabras, menos comumente esparsamente pilosas perto do ápice, e lâminas glabras na face abaxial, densamente pilosa na face adaxial, com densos tufo de tricomas na base da superfície adaxial (Figura 1C e D). A inflorescência é contraída a subcontraída, medindo de 12 a 32 cm e incluindo numerosos racemos alternados em um eixo central diferenciados em nós e entrenós. Apresenta tanto espiguetas sésseis como pediceladas, possuindo de 1,7 a 2,5 mm de comprimento com flor pistilada e cariopse de 0,7 a 1 mm (Welker *et al.*, 2012).

Esta espécie está presente em quase metade dos países da América do Sul: Colômbia, Bolívia, Paraguai, Argentina e Brasil (Swallen, 1966). No Brasil, ocorre dos estados de Goiás a Santa Catarina (Swallen 1966, Smith *et al.* 1982) e no Rio Grande do Sul, nos pântanos e campos úmidos (Welker *et al.*, 2012).

Eriochrysis villosa

Welker e Longhi-Wagner (2012) descreveram essas plantas com 40 a 160 cm de altura, bainhas foliares vilosas, menos comumente glabras ou glabrescentes, e lâminas vilosas ou glabras em ambas as superfícies, com densos tufo de tricomas na base da superfície adaxial atrás da lígula (Figura 1B e D). Inflorescência contraída medindo entre 8 e 22 cm de comprimento, densamente pilosa, com as espiguetas praticamente escondidas entre os tricomas de cor marrom-dourada. Espiguetas com 2 a 3,5 mm de comprimento e cariopse de 0,8 a 1,2 mm de comprimento.

São encontradas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná em pântanos e pastagens úmidas (Swallen, 1966; Smith *et al.*, 1982). São encontrados com flores e frutas principalmente de novembro a abril (Welker *et al.*, 2012).

Eriochrysis aff. *laxa*

Indivíduos de fenótipo intermediário, apresentando espiguetas obovadas como em *E. laxa*, mas inflorescências densamente pilosas como em *E. cayennensis* e *E. villosa*. O ápice da gluma inferior é arredondado semelhante ao de *E. laxa*, mas às vezes apresenta lobos discretos (Welker *et al.*, 2012).

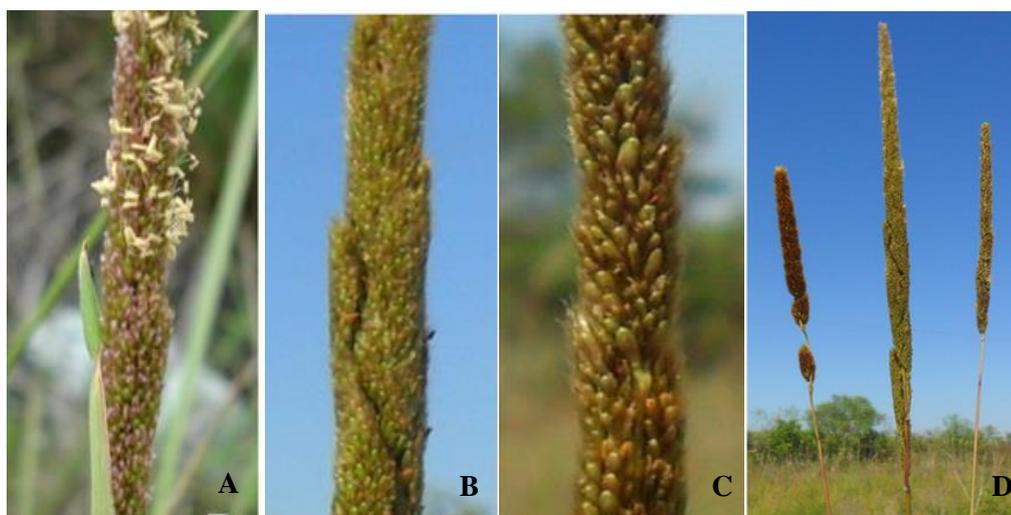


Figura 1. Inflorescências de *Eriochrysis*. A. *E. cayennensis*. B. *E. villosa*. C. *E. laxa*. Em D. Inflorescências das três espécies, respectivamente. (Fotos: Welker *et al.*, 2016).

Complexos morfológicos em *Eriochrysis* e hibridação interespecífica

A sistemática vegetal de diferentes grupos se depara constantemente com a dificuldade de delimitar a variabilidade inerente a uma espécie; contudo, em Andropogoneae esse é um fator ainda mais acentuado uma vez que as descontinuidades morfológicas úteis na delimitação de táxons estão ausentes nessa tribo (Spangler, 2000).

Estudos florísticos feitos por Welker (2010) evidenciaram a presença de complexos de espécies em *Eriochrysis*, nos quais não foi possível resolver a circunscrição das mesmas apenas com a análise morfológica. De acordo com o pesquisador, a circunscrição é bastante difícil e controversa, uma vez que há diferenças morfológicas muito tênues, além da ocorrência de indivíduos com fenótipo intermediário às espécies descritas. Um exemplo disso é o “complexo *Eriochrysis cayennensis* – *E. villosa*”, onde *E. cayennensis* apresenta grande semelhança com *E. villosa*, esta última sendo diferenciada principalmente pela gluma inferior com o ápice inteiro e agudo (Welker e Longhi-Wagner, 2012). *Eriochrysis villosa* é aceita como uma espécie distinta por vários autores (BFG, 2015; Smith *et al.*, 1982; Welker e Longhi-Wagner, 2012; Welker *et al.*, 2012), mas considerada um provável sinônimo de *Eriochrysis cayennensis* por Filgueiras (2003) e um "táxon duvidoso" por Morrone *et al.* (2008).

A simpatria entre espécies de *Eriochrysis* e a existência de indivíduos com caracteres morfológicos intermediários aponta para a ocorrência de eventos de hibridação no gênero. Com base na morfologia intermediária encontrada em uma dada população constituída por *E. cayennensis* e *E. laxa* na Bolívia, Killeen (1990) descreveu *Eriochrysis* × *concepcionensis* como um híbrido entre tais espécies. Tendo em vista que evolução reticulada na tribo Andropogoneae é bastante comum (Estep *et al.* 2014), é possível que hibridações entre outras espécies de *Eriochrysis* também ocorram no sul do Brasil.

Em um banhado no município de São Borja (RS), Welker *et al.* (2012) encontraram em simpatria plantas de *E. cayennensis*, *Eriochrysis laxa* e *E. villosa*, bem como indivíduos de morfologia intermediária os quais foram considerados putativos híbridos e tratados como *Eriochrysis* aff. *laxa*.

Posteriormente, Welker *et. al.* (2016) propuseram a primeira filogenia de *Eriochrysis* e investigaram a existência de híbridos interespecíficos dentro do gênero. Clonagem molecular e sequenciamento de cinco regiões de quatro genes nucleares de poucas cópias (apo1, d8, ep2–ex7 e ep2–ex8, kn1) foram feitos, assim como sequenciamento completo de plastoma. Baseados na existência de dois parálogos distintos nas árvores de genes nucleares, os autores propõem o status híbrido dos indivíduos *E. aff. laxa*, tendo como parentais as espécies *E. laxa* e *E. villosa* (Figura 2). É também sugerido que estes híbridos resultantes do cruzamento de espécies diploides tenham passado por um evento de duplicação do genoma, sendo possivelmente tetraploides.

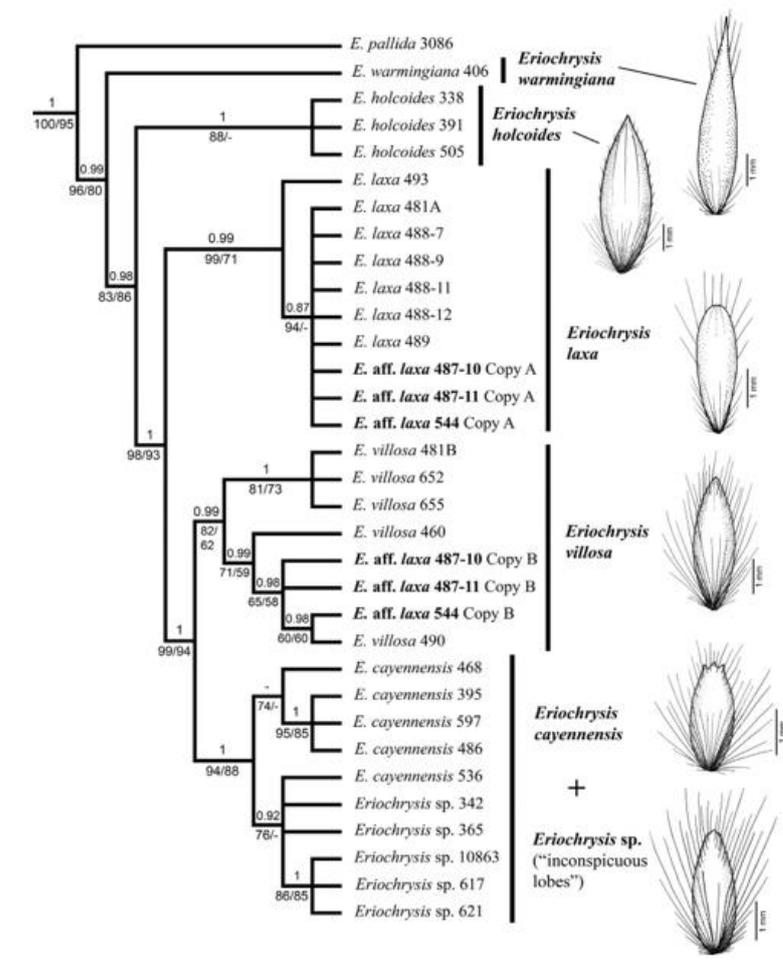


Figura 2. Filogenia de *Eriochrysis* baseada nos dados combinados dos genes apo1, d8, ep2–ex7, ep2–ex8 e kn1. Espécimes poliploides (com dois parálogos) são destacados em negrito. (Fonte: Welker *et. al.*, 2016)

4. Estudos citogenéticos

Definições taxonômicas, estudos de evolução vegetal, caracterização de germoplasmas, análises clínicas e melhoramento genético são apenas algumas das áreas da biologia nas quais análises citogenéticas podem trazer informações relevantes (Guerra, 1988).

Dentro da citogenética vegetal o número cromossômico é o parâmetro mais empregado para a compreensão das modificações genéticas que participam da evolução de um grupo, bem como na circunscrição taxonômica de espécies (Guerra, 2000; Pedrosa *et al.*, 1999) e na estruturação de filogenias (Stebbins, 1971).

Nas gramíneas os dados citogenéticos têm se mostrado de extrema valia na elucidação de questões taxonômicas e evolutivas, uma vez que é encontrada uma grande variação no número básico de cromossomos ($x = 2-18$), com número cromossômico que vai de $2n = 4$ até $2n = 260$ (Hilu, 2004), elevada ocorrência de poliploidia e de eventos de hibridação, além de uma extensa variação no tamanho do genoma.

Hilu (2004) destaca que Panicoideae é uma das subfamílias com maior diversidade de números cromossômicos, exibindo $x = 5, 7, 9, 10, 12, 14$. Gynerieae, a tribo mais basal de Panicoideae (Soreng *et al.*, 2017) possui $x = 11$. No núcleo Panicoideae, $x = 9$ e $x = 10$ prevalecem; Paniceae apresenta $x = 10$ em 21% das espécies e $x = 9$ na maioria dos táxons restantes (Hilu, 2004).

Em Andropogoneae, tribo em que se insere *Eriochrysis*, tem sido reportado $x = 10$ para 85% das espécies, e as demais com $x = 9$. Para *Thelepogon* Roth, *Sorghum* Moench, *Zea* L. e *Elionurus* Humb. & Bonpl. ex Willd. o número cromossômico básico é $x = 5$. Este padrão observado pressupõe evolução cromossômica por disploidia reducional, seguida por uma alopoliploidia que restaurou o número ancestral ($x = 10 \rightarrow 9 \rightarrow 5 \rightarrow 10$) e assim originaram os demais números (Hilu, 2004).

A poliploidia é comum para a maioria dos gêneros de Andropogoneae e um estudo feito por Estep *et al.* (2014) documentou que pelo menos um terço das espécies da tribo são resultantes de alopoliploidia, com um número notavelmente alto de eventos independentes de alopoliploidização.

O tamanho do genoma também é um caráter que varia muito em Poaceae, mesmo quando apenas diploides são considerados (valor-C de 0,50 a 9,15 pg), variando 36 vezes entre o menor e o maior valor diploide (Gaut, 2002).

Dados citogenéticos são ainda escassos para *Eriochrysis*, havendo contagem de número cromossômico para apenas três espécies do gênero: *E. brachypogon* (Stapf) Stapf (África), *E. cayennensis* (Costa Rica e Bolívia) e *E. laxa* (Bolívia). Com base no número cromossômico básico descrito para a tribo $x = 10$ (Gould, 1956; Giussani *et al.* 2001; Kellogg 2015), todas as espécies são diploides com $2n = 20$ (Dujardin, 1979; Pohl e Davidse, 1971; Killen, 1990). Embora eventos de poliploidia sejam frequentes na tribo Andropogoneae e também em Poaceae (Estep *et al.*, 2014), nenhuma das espécies investigadas até o momento é poliploide.

Dados de tamanho do genoma também não foram reportados para nenhuma espécie de *Eriochrysis*.

JUSTIFICATIVA

Dados citogenéticos para *Eriochrysis* são escassos e praticamente restritos à descrição de número cromossômico para três espécies. Informações relativas à caracterização cromossômica, ao comportamento meiótico e ao tamanho de genoma inexistem, não havendo nenhum estudo com essas abordagens para populações do gênero ocorrentes no Brasil. O uso de técnicas citogenéticas, bem como de citometria de fluxo, se mostra uma estratégia de análise promissora na delimitação das espécies, especialmente na confirmação de eventos de hibridação interespecífica.

Considerando os dados moleculares obtidos por Welker *et al.* (2016) que apontam *Eriochrysis* aff. *laxa* como um híbrido poliplóide entre *E. laxa* e *E. villosa*, a obtenção de dados citogenéticos poderá confirmar o número cromossômico e nível de ploidia dos taxa envolvidos, além de agregar importantes informações que corroborem a hipótese de hibridação interespecífica avaliando a estabilidade dos putativos híbridos. Os resultados obtidos pela abordagem citogenética poderão ainda contribuir para uma melhor delimitação das espécies de *Eriochrysis* estudadas.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente espécies pertencentes ao complexo *Eriochrysis cayennensis* – *E. villosa*, bem como da espécie *E. laxa* e supostos híbridos.

Objetivos Específicos

- Determinar o número cromossômico das três espécies de *Eriochrysis* e dos supostos híbridos;
- Avaliar o comportamento meiótico dos taxa;
- Determinar a viabilidade e a morfologia dos grãos de pólen dos parentais e do suposto híbrido;
- Estimar o tamanho do genoma para os quatro taxa.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do material vegetal

O material utilizado para as análises foi coletado nos municípios de Atlântida Sul, Cidreira e São Borja/RS, conforme coordenadas da Tabela 1. Os vouchers foram analisados e identificados pelo Dr. Cassiano A. D. Welker (Universidade Federal de Uberlândia) e foram depositados nos herbários ICN e HUFU.

Indivíduos de cada uma das espécies foram coletados e encontram-se em cultivo no viveiro do Departamento de Genética (UFRGS). A partir dessas plantas foram coletadas amostras de folhas para estimativas de tamanho de genoma.

2. Análises citogenéticas

2.1. Análises meióticas

Para as análises meióticas foram coletadas inflorescências jovens de cada um dos taxa, sendo estas fixadas em etanol : ácido acético (3:1) por um período de 12 a 24 horas em temperatura ambiente e mantidas no freezer a -20°C. O preparo das lâminas foi feito através do esmagamento de anteras em carmim propiônico 2% e a análise feita no fotomicroscópio ZeissAxioplan. O número cromossômico foi determinado através de células-mães-de-pólen nas fases de diacinese ou anáfase I. O comportamento meiótico foi investigado com base na análise de meiócitos em metáfase I e II, anáfase I e II, telófase I e II e tétrades. Tétrades foram utilizadas para estimar o índice meiótico a partir da fórmula:

$$MI = (\text{número de tétrades normais} / \text{número total de tétrades}) \times 100.$$

Tabela 1: Localidades das coletas de *Eriochrysis* no Rio Grande do Sul

Táxon	Voucher	Município	Latitude (S)	Latitude (W)
<i>E. cayennensis</i>	Welker 617 (ICN)	Cideireira	30°08'07,5"	50°11'19,7"
	Longhi-Wagner e Welker 10863 (ICN)	Osório	29°52'28,2"	50°05'39,2"
	Welker <i>et al.</i> 694 (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
<i>E. laxa</i>	Welker <i>et al.</i> 693 (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
	Welker <i>et al.</i> 695 (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
	Welker <i>et al.</i> 697c (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
<i>E. villosa</i>	Welker 541 (ICN)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
<i>E. aff. Laxa</i>	Welker 546 (ICN)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
	Welker <i>et al.</i> 696 (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"
	Welker <i>et al.</i> 697a (HUFU)	São Borja	28°38'02,5"	55°47'19,5"

2.2. Viabilidade e morfologia do pólen

Inflorescências próximas à antese foram coletadas, fixadas e armazenadas conforme descrito acima, para as análises da viabilidade dos grãos de pólen e de sua morfologia. As lâminas foram preparadas seguindo o método de Alexander (Alexander, 1980), no qual grãos de pólen vazios e não viáveis apresentam a coloração verde, enquanto grãos de pólen cheios, bem corados e viáveis coram-se de roxo. Foram analisados em torno de 500 grãos de pólen por acesso. Para determinar a forma do grão de pólen, medidas do eixo polar (P) e diâmetro equatorial (E) de 20 grãos de pólen maduros por indivíduo foram realizados após o método de coloração de Alexander. As razões P/E dos grãos foram usadas para classificar a morfologia do pólen de acordo com Erdtman (1971).

2.3. Análise de tamanho de genoma

A quantidade total de DNA foi acessada através de análises de citometria de fluxo de um indivíduo de *E. cayennensis*, três de *E. laxa*, dois de *E. villosa* e três de *E. aff. laxa*.

Para liberar os núcleos em suspensão, foi macerado cerca de 20 a 30 mg de tecido foliar de cada indivíduo e aproximadamente a mesma quantidade de material foliar da planta-padrão de referência *Secale cereale* L. (2C = 16,19pg), com auxílio de um bisturi em placa de Petri na presença do tampão de lise LB01 (1 mL) (Dolezel *et al.*, 1989). A solução proveniente desta maceração foi filtrada através de um filtro com poros de 50 µm. Os núcleos foram corados com 50 µL de uma solução de iodeto de propídio 1 mg/mL⁻¹.

Para cada amostra foram analisados ao menos 10.000 núcleos utilizando um citômetro FACS-Aria (Becton-Dickinson) e os valores 2C foram estimados através da intensidade de fluorescência relativa emitida pela amostra em conjunto com o padrão utilizando a seguinte equação:

$$\text{DNA amostra} = \left(\frac{\text{G1 da amostra}}{\text{G1 do padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

As inflorescências da amostra desconhecida e do padrão possuem uma relação linear e a partir da qual calculou-se o valor total de DNA 2C. As amostras das espécies foram examinadas e empregadas as amostras cujos coeficientes de variação (CVs) foram inferiores a 5,0. Para retratar a quantidade de DNA no cromossomo (x) fez-se uso do tamanho do genoma monoploide (1Cx) (Greilhuber *et al.*, 2005), enquanto 2C refere-se ao conteúdo total de DNA de uma célula somática.

RESULTADOS

O presente estudo traz os números cromossômicos e o comportamento meiótico dos taxa *Eriochrysis cayennensis*, *E. laxa*, *E. villosa* e *E. aff. laxa*. Esta é a primeira descrição de dados citogenéticos para tais taxa no Brasil. Para *Eriochrysis villosa* e *E. aff. laxa* não existem registros citogenéticos anteriores, o que torna inéditos os dados aqui apresentados.

Os dados citogenéticos obtidos encontram-se descritos na Tabela 2. Todos os taxa investigados são diploides ($2n = 20$) e possuem o mesmo número básico ($x = 10$). Séries poliploides ou citótipos variantes não foram encontrados.

As três espécies, bem como as plantas com morfologia intermediária (supostos híbridos), apresentaram meiose altamente regular (99,41-100%; Tabela 2; Figura 3). As anomalias mais frequentes foram bivalentes/cromossomos não orientados (metáfase I/II) (Figura 4A-B) e pontes cromossômicas (anáfase I/II) (Figura 4C). Multivalentes e univalentes não foram observados em nenhum taxa. O índice meiótico foi alto para todos os taxa, assim como a viabilidade do pólen (100% para ambos os parâmetros; Tabela 2; Figura 3-5).

Os grãos de pólen foram classificados de acordo com a razão P/E dos eixos (Tabela 2): as três espécies possuem grãos do tipo prolado esferoidal, o mesmo para *E. aff. laxa*. O tamanho dos grãos de pólen foi relativamente similar para os quatro taxa, com as menores medidas observadas em *E. cayennensis* ($P = 39,39 \mu\text{m}$ e $E = 38,62 \mu\text{m}$) e as maiores em *E. villosa* ($P = 42,43 \mu\text{m}$ e $E = 43,78 \mu\text{m}$), ambas diploides. Uma aparente variabilidade no tamanho dos grãos de pólen foi encontrada em *E. villosa* (Figuras 5E).

Tabela 2 – Análises citogenéticas do comportamento meiótico em células mãe-de-pólen e viabilidade polínica. Medidas dos eixos de grãos de pólen e classificação morfológica segundo Erdtmann (1971). Quantidade de DNA em picogramas (2C) e coeficiente de variação para análises de citometria (CV).

Taxa	Número cromossômico (n)	Meiose I e II		Índice meiótico %	Viabilidade polínica		Eixo polar do pólen (P) (µm)	Eixo equatorial do pólen (E) (µm)	Razão P/E	Morfologia	Tamanho de genoma	
		N*	%†		N*	%‡					2C	CV
<i>Eriochrysis cayennensis</i>	10	844 (3)	99,41 ^[1]	100	526 (1)	100	39,39	38,62	1,02	Prolado esferoidal	3,33	4,20
<i>Eriochrysis laxa</i>	10	591 (2)	99,83 ^[2]	100	1447 (3)	100	40,98	40,15	1,02	Prolado esferoidal	3,42	4,65
<i>Eriochrysis villosa</i>	10	555 (2)	100	100	920 (2)	100	42,44	43,78	1,02	Prolado esferoidal	3,46	4,95
<i>Eriochrysis aff. laxa</i>	10	1527 (3)	99,87 ^[3]	100	1720 (4)	100	41,33	41,25	1,00	Prolado esferoidal	3,41	4,53

*N, Número de células analisadas (número de indivíduos)

† Porcentagem de células normais

‡ Porcentagem de grãos de pólen viáveis (grãos de pólen corados)

^[1] Cinco anáfases I com ponte cromossômica de 166 analisadas

^[2] Uma metáfase II com cromossomos não orientados de 193 analisadas

^[3] Duas metáfases I com bivalentes não orientados de 92 analisadas

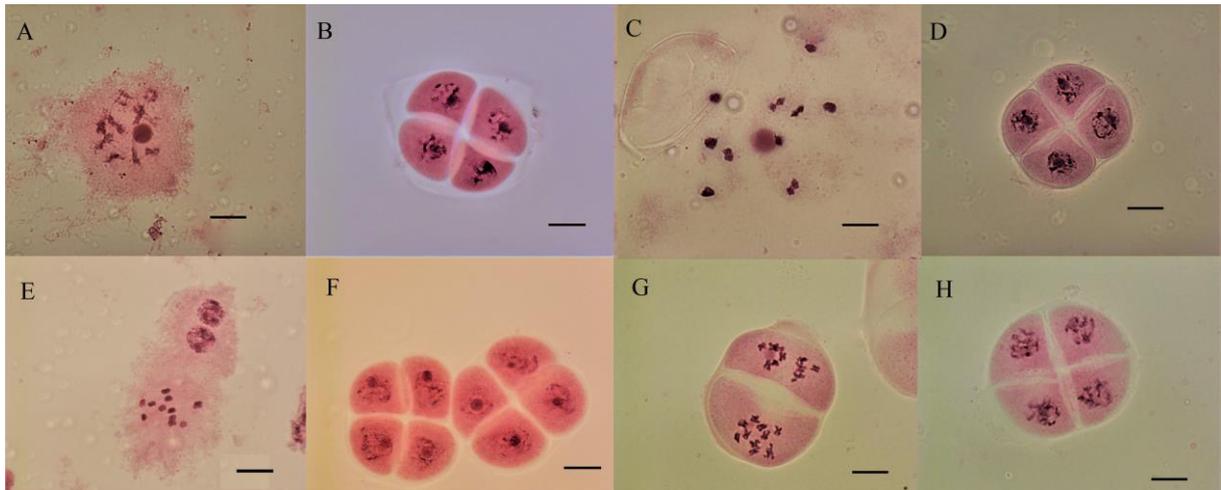


Figura 3. Análise meiótica em taxa de *Eriochrysis*. A-B. *E. cayennensis*. A. Diacinese com 10 bivalentes. B. Tétrade. C-D. *E. laxa*. C. Diacinese com 10 bivalentes. D. Tétrade. E-F. *E. villosa*. E. Metáfase I. F. Tétrades. G-H. *E. aff. laxa*. G: Prófase II. H. Tétrade. Escala 10 μ m.



Figura 4. A-B. Cromossomos não-orientados. A. Metáfase I de *E. aff. laxa*. B. Metáfase II de *E. laxa*. C. Pontes cromossômicas em anáfase I de *E. cayennensis*. Escala 10 μ m.

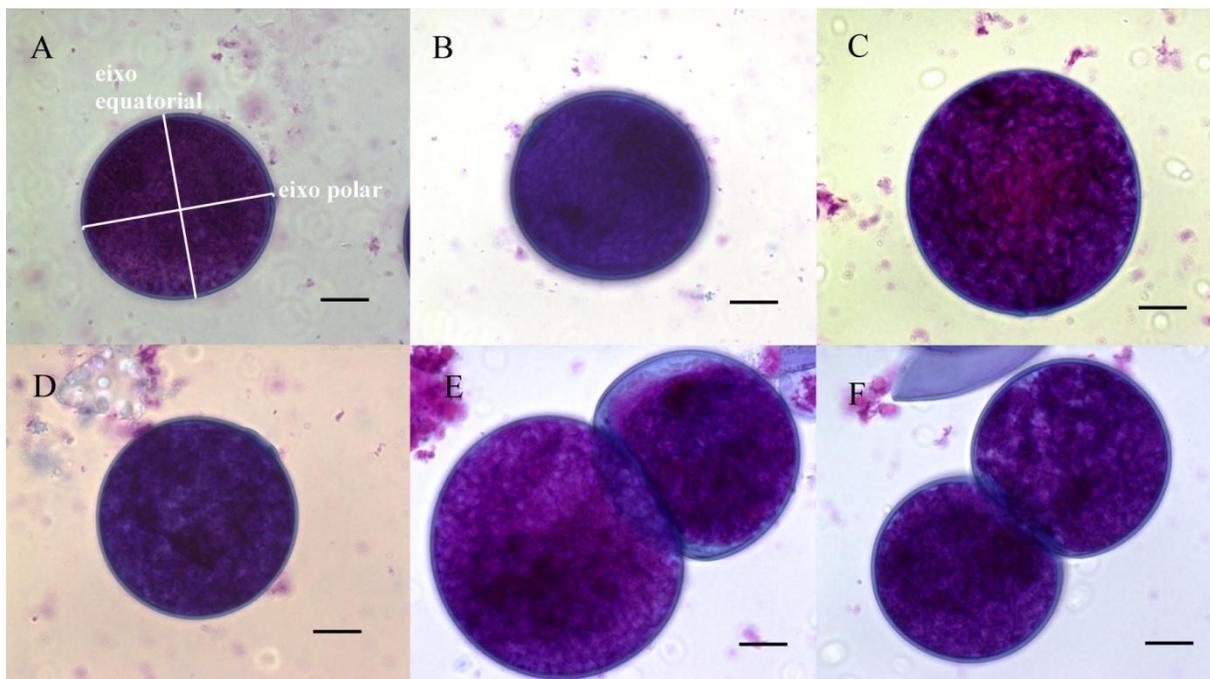


Figura 5. Pólenes viáveis. A. *E. cayennensis*. B. *E. laxa*. C. *E. villosa*. D. *E. aff. laxa*. E-F. Variabilidade de tamanho dos grãos de pólen de *E. villosa*. Escala 10 μ m.

DISCUSSÃO

Os dados aqui obtidos demonstram que o número de cromossomos básico $x = 10$ é constante entre os taxa do grupo, seguindo o número básico encontrado na maior parte das espécies da tribo Andropogoneae (Hilu, 2004). Assim sendo, todas as espécies analisadas são diplóides com $2n = 2x = 20$.

Esse mesmo número cromossômico foi reportado previamente para plantas de *E. cayennensis* da Costa Rica e da Bolívia e para indivíduos de *E. laxa* da Bolívia (Pohl e Davidse, 1971; Killeen, 1990). Embora a poliploidia seja amplamente relatada nas gramíneas em geral e também na tribo em questão (Estep *et al.*, 2014), não tem sido evidenciada até então a ocorrência de citótipos poliploides para *Eriochrysis*.

Para *E. aff. laxa* foi também observado $2n = 20$, sendo esse, portanto, também diplóide. Tal resultado discorda daquele inicialmente esperado por nossa equipe, tendo em vista os dados moleculares obtidos por Welker *et al.* (2016), os quais sugerem uma condição triploide ou tetraploide para os supostos híbridos.

Os dados de conteúdo de DNA também apontam para um mesmo nível de ploidia para todas espécies e para *E. aff. laxa*, uma vez que os valores $2C$ foram bastante próximos, ao redor de 3,4 pg. Estimativas de tamanho de genoma não são relatadas para nenhuma espécie de *Eriochrysis*; contudo, são encontrados alguns registros para gêneros próximos como *Saccharum* L., *Miscanthus* Andersson e *Erianthus* Michx. (RBG Kew DNA C-values). É interessante observar uma provável relação entre o tamanho do pólen e a quantidade de DNA, uma vez que *E. cayennensis* apresenta os menores grãos de pólen e também o menor valor $2C$, enquanto *E. villosa* tem os maiores grãos e o maior $2C$.

Informações relativas ao comportamento meiótico e à viabilidade de pólen são valiosas para inferir os mecanismos envolvidos no processo evolutivo de um grupo taxonômico, especialmente quando hibridação e poliploidia são investigadas (Moraes *et al.*, 2015) . Baixas frequências de anormalidades meióticas foram encontradas para

todos os indivíduos analisados das três espécies, bem como elevada viabilidade polínica, indicando que as plantas são totalmente macho-férteis. A estabilidade meiótica encontrada é esperada para espécies diplóides e indica que são espécies já bem estabelecidas.

Seguindo os parâmetros morfológicos empregados por Welker *et al.* (2016), os indivíduos coletados e investigados no presente estudo apresentam fenótipo intermediário a *E. laxa* e *E. villosa*, sendo putativos híbridos e possivelmente tetraploides. Contudo, os resultados citogenéticos aqui apresentados para esses indivíduos indicam claramente serem estes diplóides com uma alta estabilidade meiótica e fertilidade, assim como observado para seus supostos parentais, diferentemente do esperado com base nos dados moleculares de Welker *et al.* (2016).

Tais resultados parecem se contrapor aos dados moleculares publicados, porém é preciso analisá-los com cautela. A expectativa inicial seria de encontrar plantas com $2n = 40$, possivelmente com instabilidade meiótica e baixa fertilidade em função de ser um evento contemporâneo de hibridação interespecífica.

Um primeiro ponto a ser considerado em relação à inexistência de poliploides é que a comunidade de plantas investigada poderia ser composta de híbridos diplóides e tetraploides, tendo sido amostrados diferentes citótipos nas duas investigações. Ou ainda, os híbridos, embora diplóides, possuíam certas regiões genômicas duplicadas gerando um padrão que na análise molecular empregada foi interpretada como poliploidia. Embora com pouca sustentação, tais possibilidades não podem ser totalmente descartadas.

Mesmo que a poliploidia não tenha sido verificada para nenhum dos espécimes de *E. aff. laxa* analisados no presente trabalho, isso não inviabiliza sua condição híbrida, uma vez que poderiam ser estes homoploides. Contudo, híbridos interespecíficos, especialmente aqueles que não passaram por poliploidização, usualmente exibem altas taxas de esterilidade. Um exemplo a ser citado é o dos híbridos *Eriochrysis* × *concepcionensis* T. Killeen (*E. cayennensis* X *E. laxa*) encontrados por Killeen (1990), os quais apresentaram mais de 80% de grãos de pólen inviáveis e ausência de sementes

formadas. Tendo em vista tais resultados em *Eriochrysis*, onde inclusive um dos parentais é o mesmo de nossos putativos híbridos, é questionável a condição híbrida dos indivíduos intermediários investigados no presente estudo.

Por outro lado, Norrmann (2009) analisou o comportamento meiótico entre híbridos interespecíficos no complexo *Andropogon lateralis* Ness, pertencentes à mesma tribo de *Eriochrysis*, tendo observado uma alta frequência de bivalentes em todos os cruzamentos, o que aponta para a existência de uma homologia cromossômica ancestral ou uma homoeologia em todas as espécies estudadas, com pequenas diferenças entre os genomas básicos. Também para outros gêneros de Andropogoneae relacionados a *Eriochrysis*, como *Saccharum*, *Erianthus*, *Miscanthus*, e *Narenga* Bor, são descritos híbridos interespecíficos com meiose bastante regular, semelhantemente a seus parentais (Burner, 1991).

Na tentativa de melhor entender a situação, é preciso ter em mente que as plantas empregadas nas análises moleculares por Welker *et al.* (2016) não são as mesmas coletadas para o estudo citogenético. Embora as coletas de 2018 para as análises citogenéticas tenham sido realizadas com a colaboração do Dr. Cassiano Welker e tenham sido empregados os mesmos critérios para definir as espécies e os supostos híbridos, a enorme variabilidade fenotípica encontrada dentro desse complexo é um fator que dificulta a definição do status híbrido a partir de caracteres morfológicos. Assim, é possível que os indivíduos analisados não sejam híbridos.

Outro ponto a ser ressaltado é que há um lapso de tempo de mais de três anos entre as duas coletas e análises. Assim, considerando que: 1) a manutenção de híbridos espontâneos na natureza é bastante dificultada por diversas barreiras reprodutivas pré e pós- zigóticas; 2) os parentais, *E. laxa* e *E. villosa*, apresentam distribuição geográfica distinta (a primeira de ampla distribuição e a segunda bem mais restrita) com poucos locais de simpatria; 3) em nenhum outro local de co-ocorrência dessas espécies foram encontrados indivíduos intermediários assemelhados a *E. aff. laxa*, é possível que a ocorrência de eventos de hibridação (ou ainda aloploidização) seja extremamente limitada, esporádica e com baixa capacidade de manutenção dos híbridos. Ou seja, os

híbridos analisados por Welker *et al.* (2016) podem não ter se mantido na natureza. É possível ainda que o pequeno número de indivíduos com morfologia intermediária analisados neste trabalho somente expressem a variação morfológica das espécies em questão.

CONCLUSÃO

As análises citogenéticas realizadas não foram capazes de confirmar a condição de híbrido tetraploide para *E. aff. laxa* como proposto a partir das análises moleculares prévias. Com base nas informações atuais, acreditamos que esses indivíduos aqui analisados sejam um retrato da plasticidade fenotípica das espécies envolvidas, principalmente de *E. laxa*. Para melhor elucidar esse panorama, propomos a realização de novas coletas de um maior número de indivíduos intermediários e parentais, visando tanto análises moleculares empregando outros marcadores como SSR, como também análises citogenéticas complementares com caracterização cariotípica por métodos convencionais e FISH. Indubitavelmente o uso de sonda de DNA genômico por meio de GISH poderá trazer valiosos *insights* para elucidar tais demandas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *StainTechnol* 55:13-18, 1980.
- Allem, C.A. e Valls, J.F.M. Recursos forrageiros nativos do Pantanal Mato-Grossense. Brasília, EMBRAPA-CENARGEN, 1987.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc*141, 399–436, 2003.
- Bennett, M.D., Leitch, I.J. 2012. Plant DNA C-values database. Kew: Royal Botanic Gardens. Available at: [http:// data.kew.org/cvalues/](http://data.kew.org/cvalues/). Acessado em 12 de julho de 2018.
- BFG (The Brazil Flora Group). Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66, 1085–1113. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201566411>, 2015.
- Boldrini, I.I., Longhi-Wagner, H.M. e Boechat, S.C. *Morfologia e taxonomia de gramíneas sul-rio-grandenses*. Porto Alegre: Editora da UFRGS. 2 ed., 96 p, 2008.
- Burner, D. M. Cytogenetic analyses of sugarcane relatives (Andropogoneae:Saccharinae). *Euphytica* 54: 125–133, 1991.
- Chen, S., S. Bixing, S. M. Phillips, e S. A. Renvoize. Tribe Andropogoneae. Pp. 570–573 in *Flora of China*, vol. 22, Poaceae, eds. W. Zhengyi, P. H. Raven, e H. Deyuan. Beijing and St. Louis, Missouri: Science Press and Missouri Botanical Garden, 2006.
- Clayton W.D., Renvoize S.A. *Genera graminum: grasses of the world*. Her Majesty's Stationery Office, London, UK, 1986.
- Doğan, H.M., Cabi, E., Doğan, M. Mapping and analyzing the spatial distribution of the tribe Triticeae Dumort. (Poaceae) in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 41: 37-46, 2017. DOI:10.3906/bot-1604-11
- Dolezel, J., Binarova, P., Lucretti, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plantarum* 31:113-112. 1989.

- Dujardim, M. Additional chromosome numbers and meiotic behaviour in tropical African grasses from western Zaire. *Can. J. Bot.* 57, 864–876, 1979. <http://dx.doi.org/10.1139/b79-107>.
- Erdtman, G. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms: An Introduction to Palynology*. Hafner Publishing Company, New York, 553 pp, 1971.
- Estep, M.C., McKain, M.R., Vela Diaz, D., Zhong, J., Hodge, J.G., Hodkinson, T.R., Layton, D.J., Malcomber, S.T., Pasquet, R., Kellogg, E.A. Allopolyploidy, diversification, and the Miocene grassland expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 15149–15154, 2014. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1404177111>.
- Filgueiras, T.S. *Eriochrysis* P. Beauv. In: Zuloaga, F.O., Morrone, O., Davidse, G., Filgueiras, T.S., Peterson, P.M., Soreng, R.J., Judziewicz, E.J. (Eds.), *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): III. Subfamilies Panicoideae, Aristidoideae, Arundinoideae and Danthonioideae*. *Contr. U.S. Natl. Herb.* vol. 46, pp. 239–240, 2003.
- Filgueiras, T.S., Canto-Dorow, T.S., Carvalho, M.L.S., Dórea, M.C., Ferreira, F.M., Mota, A.C., Oliveira, R.C. de, Oliveira, R.P., Reis, P.A., Rodrigues, R.S., Longhi-Wagner, H.M., Santos-Gonçalves, A.P., Shirasuna, R.T., Silva, A.S., Silva, C., Valls, J.F.M., Viana, P.L., Welker, C.A.D., Zanin, A. 2015. Poaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Poaceae. In: *Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB193>>. Acesso em 05 junho 2018.
- Filgueiras, T.S. e Welker, C.A.D. *Eriochrysis*. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil 2012*. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB013233>, 2012. Acessado em 09 junho 2018.
- Giussani, L.M., Cota-Sánchez, J.H., Zuloaga, F.O., Kellogg, E.A. 2001. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C4 photosynthesis. *Amer. J. Bot.* 88: 1993–2012, 2001.

- Gould, F. W. Chromosome counts and cytotaxonomic notes on grasses of the tribe Andropogoneae. *American Journal of Botany*, 43(6), 395–404, 1956. <http://www.jstor.org/stable/2439014>.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group). Phylogeny and subfamily classification of the grasses (Poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 373–430, 2001.
- Greilhuber, J.; Dolezel, J.; Lysáky, M. A. e Bennett, M. D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 95:255–260, 2005.
- Guerra, M. Introdução à Citogenética Geral. In: Guerra M. (eds.) *Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35,1988.
- Guerra, M. Chromosome number variation and evolution in Monocots. Pp. 127-136. In: K. L. Wilson e D. A. Morrison (Eds.). *Monocots: systematics and evolution*. CSIRO, Melbourne, 2000.
- Hervé, A.M. e Valls, J.F.M. O gênero *Andropogon* L. (Gramineae) no Rio Grande do Sul. *Anuário Técnico do IPZFO* 7: 317-410, 1980.
- Hilu, K.W. Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Australian Journal of Botany* 52:13–22, 2004.
- Killeen, T.J. The grasses of Chiquitanía, Santa Cruz, Bolivia. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77, 125–201, 1990. <http://dx.doi.org/10.2307/2399632>.
- Kellogg E.A. Evolutionary history of the grasses. *Plant Physiology* 125: 1198-1205, 2001.
- Kellogg, E. A. Tribe Andropogoneae Dumort. Pp. 289–314 in *The families and genera of vascular plants vol. XIII*, ed. K. Kubitski. Cham, Switzerland: Springer International, 2015.
- Moraes, A.P., Souza-Chies, T.T., Stiehl-Alves, E.M., Burchardt, P., Eggers, L., Siljak-Yakovlev S., Brown, S.C., Chauveau, O., Nadot, S., Bourge, M., Viccini, L. F., Kaltchuk-Santos, E. Evolutionary trends in Iridaceae: New cytogenetic findings from the New World. *Bot J Linn Soc* 177:27-49, 2015.

- Morrone, O., Zuloaga, F.O., Longhi-Wagner, H.M., Izaguirre, P., Beyhaut, R., Cialdella, A.M., Giussani, L., Denham, S.S., Guglieri, A., Boldrini, I., Zanin, A., Salariato, D., De Gennaro, D. Poaceae. In: Zuloaga, F.O., Morrone, O., Belgrano, M.J. (Eds.), *Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), Pteridophyta, Gymnospermae y Monocotyledoneae*, vol. 1. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, pp. 609–967, 2008.
- Norrmann, G. A. “Natural hybridization in the *Andropogon lateralis* complex (Andropogoneae, Poaceae) and its impact on taxonomic literature,” *Botanical Journal of the Linnean Society*, vol. 159, no. 1, pp. 136–154, 2009.
- Pedrosa, A.; Gitaí, J.; Silva, A. E. B.; Felix, L. P.; Guerra, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Bot. Bras.* 13: 49-60, 1999.
- Peterson, P.M. *Poaceae (Gramineae)*. eLS John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2013.
- Pohl, R.W., Davidse, G. Chromosome numbers of Costa Rican grasses. *Brittonia* 23, 293–324, 1971. <http://dx.doi.org/10.2307/2805632>.
- Soares, Joyce. Flow cytometry reliability analysis and variations in sugarcane DNA content. *Genetics and molecular research: GMR*. 14. 7172-7183, 2015.
- Osborne, C.P., Visser, V., Chapman, S., Barker, A., Freckleton, R.P., Salamin, N., Simpson, D. e Uren, V. 2011. *Grass-Portal: an online ecological and evolutionary data facility*. Disponível em: <<http://www.grassportal.org>>. Acesso em 14 maio 2018.
- Rúgolo de Agrasar, Z.E. e Puglia, M.L. Gramíneas ornamentales. vol. 1. Pp. 1-336. In: Hurrell, J.A. (ed.). *Plantas de la Argentina: silvestres y cultivadas*. Buenos Aires, LOLA, 2004.
- Spangler, R.E. Andropogoneae systematics and generic limits in *Sorghum*. Pp. 167-170. In: Jacobs, S.W.L. e Everett, J. (eds.). *Grasses: systematics and evolution*. Melbourne, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), 2000.
- Simon, B. K. Grass phylogeny and classification: Conflicts of morphology and molecules. *Aliso* 23: 259–266, 2007.

- Smith, L.B., Wasshausen, D.C., Klein, R.M. Gramíneas. Gêneros: 85. *Paspalum* até 115. *Zea*. In: Reitz, R. (Ed.), Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, pp. 909–1408, 1982.
- Soreng RJ, Peterson PM, Romaschenko K, Davidse G, Teisher JK, Clark LG, Barbera P, Gillespie LJ, Zuloaga FO. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II. An update and comparison of two 2015 classifications. *Journal of Systematics and Evolution* 55:259–290, 2017. DOI 10.1111/jse.12262.
- Stebbins, G. L. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold, London, 1971.
- Swallen, J.R. Notes on grasses. *Phytologia* 14: 65–98, 1966.
- The Plant List: A Working List of All Plant Species, Version 1.1. Royal Botanic Gardens, Kew e Missouri Botanical Garden, 2016. <<http://www.theplantlist.org/>> Acesso em 09 junho 2018.
- Thomasson, J.R. Fossil grasses: 1820–1986 and beyond. pp.159–167 in, T.R. Soderstrom, K.W. Hilu, C.S. Campbell, e M.E. Barkworth, eds. *Grass Systematics and Evolution*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC 473 pp, 1987.
- Watson, L., Dallwitz, M.J. *The Grass Genera of the World*. C.A.B. International, Wallingford, 1992.
- Welker, C.A.D. Os gêneros *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo, *Saccharum* L. e *Schizachyrium* Nees (Poaceae – Andropogoneae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
- Welker, C.A.D. e Longhi-Wagner, H.M. A família Poaceae no Morro Santana, Rio Grande do Sul, *Brasil. R. bras. Bioci.*, 5(4): 53-92, 2007.
- Welker, C.A.D. e Longhi-Wagner, H.M. New records in *Schizachyrium* Nees (Poaceae - Andropogoneae) for Rio Grande do Sul and for Brazil. *Rodriguésia* 63(4): 1147–1150, 2012.
- Welker, C.A.D., Longhi-Wagner, H.M. The genera *Eriochrysis* P. Beauv., *Imperata* Cirillo and *Saccharum* L. (Poaceae–Andropogoneae–Saccharinae) in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Bot.* 35, 87–105, 2012. doi:10.1590/S0100-84042012000100010

- Welker, C.A.D., Longhi-Wagner, H.M., Souza-Chies, T.T. New record for *Eriochrysis* (Poaceae: Andropogoneae) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, and a key to the species of *Eriochrysis* in Brazil. Magnolia Press, Phytotaxa, 2012.
- Welker, C.A.D., Souza-Chies, T.T., Longhi-Wagner, H.M., Peichoto, M.C., McKain, M.R., Kellogg, E.A. Multilocus phylogeny and phylogenomics of *Eriochrysis* P. Beauv. (Poaceae–Andropogoneae): Taxonomic implications and evidence of interspecific hybridization. Elsevier. Molecular Phylogenetics and Evolution 99 (2016) 155–167, 2016.