



**ANE MARCELA DAS CHAGAS MENDONÇA**

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E  
BIOQUÍMICAS PARA RECONHECIMENTO  
DOS TIPOS FOTOSSINTÉTICOS DE POÁCEAS  
DA SUBTRIBO ARTHROPOGONINAE**

**LAVRAS- MG**

**2017**

**ANE MARCELA DAS CHAGAS MENDONÇA**

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS PARA  
RECONHECIMENTO DOS TIPOS FOTOSSINTÉTICOS DE POÁCEAS  
DA SUBTRIBO ARTHROPOGONINAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Ecofisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa

Orientador

Rowan F. Sage, PhD

Coorientador

**LAVRAS- MG**

**2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Mendonça, Ane Marcela das Chagas.

Características anatômicas e bioquímicas para reconhecimento  
dos tipos fotossintéticos de poáceas da subtribo arthropogoninae /  
Ane Marcela das Chagas Mendonça. - 2017.

149 p.

Orientador: João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.  
Bibliografia.

1. Evolução C4. 2. Gramíneas. 3. Clado Homolepis/Mesosetum.  
I. Barbosa, João Paulo Rodrigues Alves Delfino. II. Título.

**ANE MARCELA DAS CHAGAS MENDONÇA**

**CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E BIOQUÍMICAS PARA  
RECONHECIMENTO DOS TIPOS FOTOSSINTÉTICOS DE POÁCEAS  
DA SUBTRIBO ARTHROPOGONINAE**

***ANATOMICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS TO  
RECOGNIZE THE PHOTOSYNTHETIC TYPES IN GRASSES OF  
SUBTRIBE ARTHROPOGONINAE***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Ecofisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 07 de abril de 2017.

|   |         |
|---|---------|
| Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro      | UNICAMP |
| Prof. Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori | UFLA    |
| Prof. Dr. Jean Marcel Sousa Lira          | UNIFAL  |
| Prof. Dr. Fabricio José Pereira           | UNIFAL  |

Prof. Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa  
Orientador

Rowan F. Sage, PhD  
Coorientador

**LAVRAS- MG**

**2017**

A Mary Cristina, que sempre me incentivou a lutar pelo que eu acredito.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir a conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos nacional e durante o período estágio sanduíche.

Ao Departamento de Ecologia e Biologia evolutiva da Universidade de Toronto, pela aceite para o período de estágio sanduíche.

Ao Prof. João Paulo, por mais uma vez me orientar, pelo incentivo, por acreditar nesse projeto, pela paciência e disponibilidade em auxiliar e discutir o andamento do trabalho e seus resultados.

Ao Rowan F. Sage, por ser o coorientador deste trabalho, por me receber por um ano, disponibilizando tempo e estrutura laboratorial.

Aos meus pais, Marcos e Noêmia, que sempre priorizaram a educação, além de dedicarem a mim muito amor e carinho. Ao meu irmão Rafael, pela amizade e companheirismo. A minha avó Maria, que sempre me apoiou em minhas decisões, além de ser exemplo de força para mim.

Ao Paulo, por toda dedicação, amor, carinho, incentivo e pela paciência da espera. Mais uma vez, essa conquista é nossa.

Ao Dr. Pedro Viana, pelo auxílio com a coleta das espécies utilizadas e pelas discussões sobre evolução e classificação de poáceas.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da UFLA e Funcionamento de Ecossistemas, pelos momentos de auxílio, amizade e descontração. Agradeço, em especial, à Nayara, Geovane e Jean, pela ajuda durante a coleta e transporte de material vegetal e a Débora, pelo auxílio com as análises anatômicas.

À equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA e ao professor Eduardo Alves, pelo auxílio com a fixação do material e utilização da estrutura. Agradeço, em especial, a Cláudia, Elisa e Aline pela gentileza de sempre estarem disponíveis para ajudar.

Ao Team Sage, pela recepção durante o período de estágio e inserção nas atividades do laboratório. Agradeço, em especial a Tammy L. Sage, pelos conhecimentos compartilhados e pela disponibilização da estrutura de microscopia eletrônica e a Roxana, por todo auxílio, desde minha chegada até a rotina laboratorial.

À amiga Joana, por aceitar o desafio de preparar e compartilhar o material para a parte de distribuição ambiental.

À amiga Marinês, pelas discussões sobre anatomia foliar.

Ao amigo Jean, pelas discussões sobre estatística.

À banca examinadora, por aceitar a participação na defesa, contribuindo para o aprimoramento do documento.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos que auxiliaram no meu processo de formação.

Aos técnicos Joel e Odorêncio, pelo auxílio e preparação de material para o cultivo das espécies. Ao técnico Darthagnan e ao professor Luiz Edson, por permitirem a utilização do laboratório de Nutrição e Metabolismo.

Às amigas Suelen, Raquel e Nayara, por compartilharem a casa, a rotina, as histórias e os bons momentos.

Aos colegas da Fisiologia, com os quais pude compartilhar bons momentos e aos amigos que, mesmo distantes, sempre torceram por mim.

## RESUMO

A via C4 surgiu em resposta ao declínio de CO<sub>2</sub> atmosférico durante o Oligoceno. Por estar dividida em dois compartimentos, a célula do mesófilo (M) e da bainha do feixe vascular (BFV), esse tipo fotossintético diminuiu as altas taxas fotorrespiratórias da via ancestral C3, concentrando CO<sub>2</sub> no sítio da Rubisco. Condições paleoclimáticas como, aumento da aridez e de queimadas permitiu a expansão de biomas de plantas que utilizam essa via. Atualmente, plantas C4 ocupam áreas tropicais e subtropicais, sendo todas as gramíneas C4 classificadas no clado PACMAD. Frente a condições de aquecimento global, culturas C3, como o arroz, reduzem o rendimento fotossintético, sendo a inserção da via C4 uma alternativa para aumento de produção. O agrupamento de origens C4 na subtribo Arthropogoninae/ clado *Homolepis/Mesosetum* (clado PACMAD) faz desse grupo importante para o estudo das intermediárias C3 proto-Kranz, C2 e C4-like. Objetivou-se avaliar características chave entre as vias C3 e C4 para espécies da subtribo Arthropogoninae. Realizou-se o levantamento das espécies da subtribo já coletadas no Brasil, para determinação da distribuição ambiental em relação à altitude, temperatura, fogo e seca. Com fragmentos foliares herborizados determinou-se a composição isotópica de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e a anatomia foliar. Rizomas foram coletados e cultivados para análises anatômicas, ultraestruturais, de imunomarcagem enzimática e de trocas gasosas. Os dados foram analisados pela ANOVA, sendo comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Gêneros “não C4” e C4 apresentaram sobreposição em relação à distribuição ambiental, porém plantas C4 estão mais relacionadas a latitudes baixas, altas temperaturas e maior risco de seca. Em relação ao  $\delta^{13}\text{C}$ , os dados estabeleceram um padrão entre “não C4” e C4, podendo indicar presença de intermediárias. Num gradiente C3, intermediárias e C4 houve diminuição da distância entre feixes vasculares e de número de células. Nas células M a maior quantidade de organelas foi registrada para as espécies C3, enquanto nas células BFV o maior número de cloroplastos na C4. A presença de GDC nas mitocôndrias de ambos os tipos celulares em *H. isocalycia* permite classificá-la como C3 proto-Kranz. Já a *H. aturensis* é uma C2, uma vez que a GDC é restrita à célula BFV. Essas características promovem redução nos valores de ponto de compensação de CO<sub>2</sub> quando comparadas à C3 *H. glutinosa*. Dessa forma os dados mostraram que as espécies C3 e intermediárias da subtribo Arthropogoninae apresentam características que podem ser consideradas pré-adaptações para o surgimento C4. A presença de diferentes tipos intermediários e a relação filogenética como um gênero C4 faz do clado *Homolepis/Mesosetum* um modelo emergente para estudos de evolução da via C4 em poáceas.

**Palavras-chave:** Evolução C4. Gramíneas. Arthropogoninae. Clado *Homolepis/Mesosetum*. Células da bainha do feixe vascular.



## ABSTRACT

C4 pathway arose as a response to Oligocene CO<sub>2</sub> decline. It is divided between two compartments, mesophyll (M) and bundle sheath (BS) cell, being able to reduce the high C3 photorespiratory rate, concentrating CO<sub>2</sub> around the Rubisco site. Paleoclimatic conditions as increasing of aridity and fire allowed the expansion of C4 biomes. Currently, C4 grasses are classified in the PACMAD clade and occupy tropical and subtropical areas, with high temperatures. In warm climate conditions, C3 crops, as rice, reduce the photosynthetic yield, being the C4 engineering an alternative to increase production. The C4 origins clustered in the subtribe Arthropogoninae / *Homolepis*/ *Mesosetum* clade (PACMAD clade) make this group important for studies using intermediate species as C3 proto-Kranz, C2, and e C4-like. The aim was evaluate key features of C3, intermediate, and C4 pathways in species of Arthropogoninae. Occurrence data were taken for species already collected in Brazil, to determine the environmental distribution related to altitude, temperature, fire, and drought. Carbon isotope composition and leaf anatomy were obtained from herbarium material. Also, leaf anatomy, ultrastructure, immunolocalization, and gas exchange were assessed from grown plants. Data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test (P<0,05). C4 and "non C4" genus showed overlapped environmental distribution, although C4 distribution is more related to low latitudes, high temperatures, and higher drought risk areas. The δ<sup>13</sup>C data were able to establish a pattern between "non C4" and C4, besides indicating the presence of intermediate species. The distance between veins and the number of mesophyll cells were reduced in a C3, intermediate, and C4 gradient. In the M cells, the C3 species showed the higher number of organelles, while in the BS cells the higher number of chloroplast was observed in the C4 species. The presence of GDC in the mitochondria of both cell compartments allowed classifying *H. isocalyca* as C3 proto-Kranz. In contrast *H. aturensis* is a C2, since the GDC is almost restricted located in the BS mitochondria. Those features promote a reduction in CO<sub>2</sub> compensation point when compared to C3 *H. glutinosa*. In conclusion, C3 and intermediate species of Arthropogoninae may have preadaptations to enable the C4 evolution. The *Homolepis/Mesosetum* clade has different intermediate types and does not lack phylogenetic relation with a C4 genus, being an emergent model for C4 studies in grasses.

**Key words:** C4 evolution. Grasses. Arthropogoninae. *Homolepis/Mesosetum* clade. Bundle sheath cells.

## SUMÁRIO

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1   | INTRODUÇÃO .....   | 11 |
| 2   | REFERENCIAL TEÓRICO .....  | 15 |
| 2.1 | Caracteres anatômicos e bioquímicos diferenciam as vias fotossintéticas C3 e C4.....   | 15 |
| 2.2 | Declínio na concentração atmosférica de CO <sub>2</sub> como condição promotora do surgimento da via C4 .....  | 18 |
| 2.3 | O estabelecimento de forte sazonalidade influenciou a expansão e a dominância de ecossistemas C4 .....   | 23 |
| 2.4 | Poáceas C4 são típicas de ambientes tropicais e subtropicais .....   | 28 |
| 2.5 | As poáceas C4 são classificadas no grupo PACMAD possuindo pontos intermediários entre as duas vias fotossintéticas .....   | 32 |
| 2.6 | O conhecimento sobre como as espécies intermediárias medeiam a transição entre as vias C3 e C4 pode auxiliar no aumento do rendimento em culturas C3 .....                       | 36 |
| 3   | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 39 |
| 3.1 | Mapas de Distribuição Ambiental.....   | 39 |
| 3.2 | Material Vegetal .....   | 39 |
| 3.3 | Composição isotópica de carbono em matéria seca .....  | 40 |
| 3.4 | Anatomia foliar, ultraestrutura e imunomarcção enzimática .....  | 41 |
| 3.5 | Trocas Gasosas.....  | 43 |
| 3.6 | Análise de dados .....   | 44 |
| 4   | RESULTADOS .....   | 45 |
| 4.1 | Distribuição ambiental.....  | 45 |
| 4.2 | Composição isotópica de carbono em matéria seca .....  | 50 |
| 4.3 | Anatomia foliar .....  | 52 |
| 4.4 | Ultraestrutura e imunomarcção enzimática .....   | 62 |
| 4.5 | Trocas gasosas.....  | 68 |
| 5   | DISCUSSÃO .....  | 71 |
| 5.1 | A sobreposição de nichos ecológicos entre gêneros “não C4” e C4 da subtribo Arthropogoninae evidencia a pré-disposição para a evolução dessa via fotossintética nesse grupo..... | 71 |
| 5.2 | Pré-adaptações das células da bainha do feixe vascular de poáceas C3 e intermediárias do clado Arthropogoninae facilitam o surgimento da via C4.....                             | 76 |
| 5.3 | O rearranjo de organelas e de distribuição enzimática no clado <i>Homolepis-Mesosetum</i> representam etapas no surgimento da via C4 .....                                       | 83 |
| 5.4 | A glicina descarboxilase modifica a relação isotópica de carbono e reduz o ponto de compensação de CO <sub>2</sub> .....   | 88 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 5.5 | As características intermediárias de <i>Homolepis isocalyca</i> e <i>H. aturensis</i> faz do clado <i>Homolepis-Mesosetum</i> um modelo anatômico e bioquímico de evolução C4 em poáceas ..... | 94  |
| 6   | CONCLUSÃO.....   | 103 |
|     | REFERÊNCIAS .....  | 105 |
|     | ANEXO A - DADOS E IMAGENS ADICIONAIS PARA AS ESPÉCIES DA SUBTRIBO ARTHOPOGONINAE ESTUDADAS .....   | 121 |

## 1 INTRODUÇÃO

A Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) é uma enzima carboxilativa primária utilizada no ciclo fotossintético C3, capaz de fixar CO<sub>2</sub> e incorporá-lo em carboidratos. Por ter surgido a cerca de 2900 milhões de anos (Ma) em uma atmosfera desprovida de O<sub>2</sub>, não havia necessidade para a existência de uma enzima capaz de diferenciar CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (CHRISTIN; OSBORNE, 2013). Com a diminuição gradual da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub>, a Rubisco começou a utilizar O<sub>2</sub> como substrato, dando início a um processo chamado fotorrespiração, causando perdas de carbono na via C3 (BAUWE, 2011). Nesse contexto, surge a via fotossintética C4, que é um conjunto de adaptações bioquímicas e anatômicas capaz de concentrar CO<sub>2</sub> ao redor do sítio da enzima Rubisco (SAGE, 2004; EDWARDS, STILL, 2008).

O surgimento da via C4 requer modificações que envolvem adaptações anatômicas, e recrutamento de diversas enzimas em novas funções bioquímicas (EDWARDS, 2014). Por possuir uma divisão espacial do processo fotossintético, plantas que utilizam essa via são capazes de fixar CO<sub>2</sub> na célula do mesofilo<sup>1</sup>, utilizando a carboxilase do fosfoenolpiruvato (PEPc), enzima que não possui afinidade pelo oxigênio, como enzima carboxilativa primária, transportar ácidos orgânicos para a célula da bainha do feixe vascular, que são descarboxilados e o CO<sub>2</sub> refixado pela Rubisco (CHRISTIN et al., 2015). Essa via assimilatória, apesar de ser energeticamente mais cara, elimina pontos negativos relativos à fotorrespiração, sendo evolutivamente e ecologicamente bem sucedida, principalmente em ambientes quentes e secos (EDWARDS; STILL, 2008; CHRISTIN et al., 2015).

---

<sup>1</sup> Nesse trabalho, as células do parênquima clorofiliano serão tratadas como células do mesofilo, por se tratar de um termo amplamente utilizado nos trabalhos da área. Entretanto, há o entendimento de que o termo mesofilo se refere à região da folha localizada entre as duas faces epidérmicas, composta por tecidos diferentes.

Acredita-se que a primeira transição entre a via C3 e C4 ocorreu cerca de 32 Ma, durante o período Oligoceno, em um momento em que a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico atingiu concentrações de cerca 180 ppm (CHRISTIN et al., 2008). Entretanto, a expansão e dominância de linhagens C4 ocorreu somente a partir do final do Mioceno e podem ter sido influenciadas por modificações nos padrões de sazonalidade, em conjunto com fatores como incêndios e aumento da aridez (CHEN et al., 2015; KEELEY; RUNDEL, 2005). Atualmente, as plantas C4 estão distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes, em altitudes e longitudes baixas e médias (SAGE, 2004). Essa localização se relaciona com ambientes abertos, quentes e que recebem muita radiação (CHRISTIN; OSBORNE, 2014).

Essa distribuição ecológica de plantas C4 está também relacionada com a sua maior capacidade de utilização de recursos e, conseqüentemente, maior rendimento fotossintético nessas condições (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Na situação atual de aquecimento global e aumento de períodos de seca, culturas que utilizam a via C3 sofrem com a diminuição do rendimento, como é o caso do arroz (KORRES et al., 2016). Dessa maneira, a inserção da via C4 em plantas C3 poderia servir para aumentar a produção de alimentos e fibras (SCHULER; MANTEGAZZA; WEBER, 2016). Para isso, é necessário entender as etapas da evolução entre as duas vias.

A via fotossintética C4 é um exemplo expressivo de evolução convergente que ocorreu em eudicotiledôneas, poáceas e ciperáceas (CHRISTIN et al., 2013b). Estudos de filogenia demonstram a existência de pelo menos 62 grupos que adquiriram essa via independentemente (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011), sendo o maior número de linhagens encontrado em poáceas, com mais de 20 origens distintas (CHRISTIN et al., 2012). Todas as poáceas C4 ocorrem no clado PACMAD (Panicoideae, Arundinoidea, Chloridoideae, Micrairoideae, Aristidoideae, e Danthonioideae), de modo que esse agrupamento

de origens C4 no PACMAD indica que determinadas linhagens possuem características facilitadoras da evolução dessa via fotossintética (CHRISTIN; FRECKLETON; OSBORNE, 2010; GPWG II, 2012).

Portanto, uma vez que existam pré-condições, a evolução da via C4 tem possibilidade de ocorrer. Essa transição entre as vias C3 e C4 ocorreu em etapas de modo que em alguns grupos pode-se encontrar espécies intermediárias, classificadas em C3 proto-Kranz, C2 (Tipo I e II) e C4-like (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Nessas etapas, ocorre a diminuição da distância entre os feixes vasculares, a inserção das células da bainha no contexto da atividade fotossintética, o aumento do número e reposicionamento de organelas, a restrição da expressão da descarboxilase da glicina (GDC) a esse tipo celular e o início do engajamento do ciclo C4, que culminam na expressão diferenciada de Rubisco e PEPc entre as células do mesofilo e da bainha (GOWIK; WESTHOFF, 2011).

A subtribo Arthropogoninae (inclusa na subfamília Panicoideae) possui alguns pontos de transição entre as vias C3 e C4, sendo que o clado *Homolepis/Mesosetum* apresenta pontos intermediários (GPWG II, 2012; CHRISTIN et al., 2013a). O gênero “não C4”<sup>2</sup> *Homolepis* possui cinco espécies que são filogeneticamente relacionadas ao C4 *Mesosetum*, composto por mais de 40 espécies (www.tropicos.org; www.splink.org.br). Até então, o gênero *Neurachne* era o único entre as poáceas composto por espécies C3, C4 e intermediárias (CHRISTIN et al., 2012), entretanto atualmente sabe-se que a espécie *Homolepis aturensis* possui características que permite classificá-la como uma intermediária entre as duas vias fotossintéticas (CHRISTIN et al., 2013a).

---

<sup>2</sup> O termo “não C4” faz referência a espécies que utilizam a via C3 ou que representam alguma etapa intermediária entre as duas vias. Ao longo do texto, a expressão “tipo C3” pode ser usada como sinônimo.

Dessa forma, considerando a possibilidade de inserir características do ciclo C4 em plantas C3 visando à manutenção da segurança alimentar, além do elevado número de origens C4 na subtribo Arthropogoninae, alguns questionamentos podem ser levantados. Os agrupamentos de origens C4 na subtribo Arthropogoninae facilitam o surgimento dessa via? O clado *Homolepis/Mesosetum* possui etapas intermediárias entre as vias C3 e C4? O clado *Homolepis/Mesosetum* poderia ser considerado um modelo de evolução C4 em poáceas, facilitando a futuros estudos com transformação de culturas C3? Assim, objetiva-se, com este trabalho, analisar algumas espécies da subtribo Arthropogoninae, especialmente do clado *Homolepis/Mesosetum*, em relação à distribuição ambiental, características anatômicas, ultraestruturais e de trocas gasosas, visando a elucidar pontos metabólicos-estruturais da transição entre as vias C3 e C4 nesse grupo.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Caracteres anatômicos e bioquímicos diferenciam as vias fotossintéticas C3 e C4

Nas plantas C3 o  $\text{CO}_2$  é fixado pela Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), enzima carboxilativa primária capaz de catalisar  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ , tanto na célula do mesofilo quanto na célula da bainha do feixe vascular (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011). Por ter surgido em um momento em que a atmosfera terrestre possuía altas concentrações de  $\text{CO}_2$ , a dupla afinidade dessa enzima não era um problema para o rendimento fotossintético da via (CHRISTIN; OSBORNE, 2013). Entretanto, a 30 Ma, a concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  começou a decair até atingir valores referentes aos dias atuais (~400 ppm) (PAGANI et al., 2005). A partir desse momento, a dupla afinidade da Rubisco resulta no aumento da fotorrespiração. A catalisação de  $\text{O}_2$  promoveu o decréscimo do rendimento fotossintético, uma vez que ao produzir fosfoglicolato, este precisava ser reciclado pela via fotorrespiratória, consumindo ATP e liberando uma molécula de  $\text{CO}_2$  por molécula de  $\text{O}_2$  (BAUWE et al., 2011).

A estratégia utilizada para solucionar esse decréscimo de rendimento foi utilizar um mecanismo concentrador de carbono, a partir do qual há promoção do aumento de  $\text{CO}_2$  ao redor do sítio da Rubisco, sendo um deles a via fotossintética C4 (CHRISTIN et al., 2015). Dessa maneira, plantas C4 possuem uma divisão espacial, com a fotossíntese sendo realizada em dois compartimentos diferentes, as células do mesofilo e as células da bainha do feixe vascular. A PEPc é a carboxilase primária que catalisa apenas  $\text{CO}_2$  formando ácidos orgânicos de quatro carbonos na célula do mesofilo. Esses ácidos são transportados para a célula da bainha onde são descarboxilados e usados pela Rubisco, permitindo que, nesse tipo fotossintético, exista uma alta concentração



de CO<sub>2</sub>, ao redor do sítio enzimático, suprimindo a fotorrespiração (SAGE, 2004; SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011).

A evolução da via C4 é um processo complexo de aquisição de caracteres bioquímicos e anatômicos e desenvolvimento de novos atributos que permitem a existência dessa variação fotossintética (CHRISTIN; OSBORNE, 2014). Embora seja complexa, a transição entre as vias C3 e C4 não é difícil, uma vez que se parte de pré-adaptações existentes (SAGE, 2001; EDWARDS; SMITH, 2010). Essas modificações, entretanto, requerem sofisticados processos regulatórios para operar todos os níveis de expressão gênica e funcionamento proteico (LANGDALE, 2011).

Do ponto de vista bioquímico, verifica-se que a PEPc já existia em plantas C3, exercendo funções não-fotossintéticas como modulação do turgor das células-guarda, fixação anaplerótica de CO<sub>2</sub>, regulação do pH e outras (GOWIK; WESTHOFF, 2011), sendo o mesmo observado para enzimas como NADP-ME<sup>3</sup>, NAD-ME<sup>4</sup> e PEPCK<sup>5</sup> (CHRISTIN et al., 2009; SAIGO et al., 2013). Do ponto de vista anatômico, em plantas C3, existe um elevado número de células do mesofilo entre os feixes vasculares, enquanto em C4 esse número é reduzido, o que facilita a troca de metabólitos durante a fotossíntese (EDWARDS; VOZNESENSKAYA, 2011). O produto da carboxilação pela PEPc é o oxaloacetato (OAA), que pode ser convertido a malato (no tipo NADP-ME) no cloroplasto do mesofilo ou à aspartato (nos tipos NAD-ME e PEPCK) no citosol. Esses ácidos, ao serem transportados para a célula da bainha, podem ser descarboxilados pelas enzimas NADP-ME, NAD-ME ou PEPCK. No tipo NADP-ME, isso ocorre no cloroplasto da célula da bainha, já nos tipos que transportam aspartato este é convertido à OAA e/ou malato e a descarboxilação ocorre no mitocôndria (NAD-ME) ou no citosol (PEPCK) (FURBANK, 2011).

---

<sup>3</sup> Enzima descarboxilativa Desidrogenase do Malato dependente de NADP<sup>+</sup>

<sup>4</sup> Enzima descarboxilativa Desidrogenase do Malato dependente de NAD<sup>+</sup>

<sup>5</sup> Enzima descarboxilativa Carboxiquinase do Fosfoenolpiruvato

A organização anatômica envolvida na via fotossintética C4 é chamada de anatomia Kranz, caracterizada por células da bainha do feixe vascular aumentadas e células do mesofilo formando anéis concêntricos ao redor do feixe vascular (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). As células da bainha em plantas C4, além de serem maiores e mais numerosas, apresentam maior quantidade de cloroplastos do que em uma folha tipicamente C3 (MUHAIDAT et al., 2011; SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011). Em contrapartida, células do mesofilo de plantas C4 possuem cerca da metade do número de cloroplasto em relação a plantas C3, uma vez que essas organelas não estão mais envolvidas na fixação de carbono nessas células (STATA et al., 2014).

Valores de discriminação de isótopos de carbono também diferenciam C3 e C4 quanto ao metabolismo fotossintético, sendo essa característica bastante utilizada em estudos de evolução da via C4 (GPWG II, 2012). Os isótopos de carbono variam de acordo com a discriminação diferencial das enzimas Rubisco e PEPc, levando em consideração as diferenças na compartimentalização entre os dois tipos de vias fotossintéticas (BRUGNOLI; FARQUHAR, 2000). Existem dois tipos de isótopos de carbono estáveis na atmosfera, o  $^{12}\text{C}$  (mais leve) e o  $^{13}\text{C}$  (mais pesado). Em cada etapa da fotossíntese, há discriminação contra o  $^{13}\text{C}$ , sendo isso mais evidente na etapa carboxilativa (BRUGNOLI; FARQUHAR, 2000). Uma vez que a Rubisco possui maior preferência pelo isótopo mais leve, ou seja, discrimina mais contra o  $^{13}\text{C}$ , plantas C3 possuem valores médios de isótopos de carbono de -28‰ (O'LEARY, 1981). Já a PEPc, por discriminar menos contra o isótopo mais pesado, possui valores entre -13 e -8‰, a depender do tipo de enzima descarboxilativa utilizada (FARQUHAR, 1983).

Apesar de possuir gastos energéticos maiores que plantas C3, principalmente por conta da necessidade de regenerar o substrato da PEPc nas células do mesofilo (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997; VON CAEMMERER, 2000), a via C4 possui benefícios. Plantas que utilizam essa via

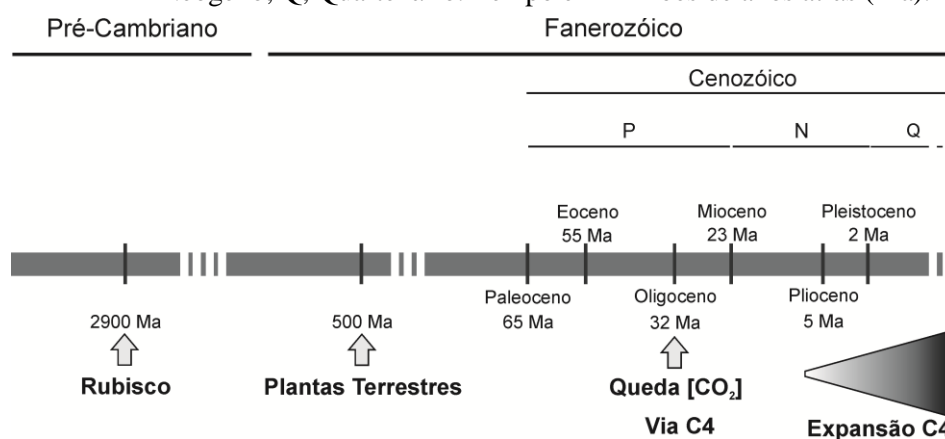
fotossintética são capazes de reduzir a fotorrespiração, pois o mecanismo concentrador de carbono utilizado por elas permite que as concentrações desse gás no compartimento celular da Rubisco atinjam valores de  $1500 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (KEELEY; RUNDEL, 2003; SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Isso contribui para maior eficiência do uso da água, por aumentar o rendimento fotossintético desses vegetais. A manutenção de altos valores de eficiência do uso da água pode ser decorrente da redução da condutância estomática, uma vez que a principal fonte de  $\text{CO}_2$  para essas espécies é proveniente dos ácidos de quatro carbonos das células do mesofilo (SAGE, 2004). Esse maior rendimento relacionado ao metabolismo fotossintético permite que, mesmo sob maior irradiância, as plantas C4 continuem sendo eficientes (SAGE; ZHU, 2011). Além disso, plantas C4 possuem maior eficiência do uso do nitrogênio, por investirem menos em Rubisco quando comparadas às C3 (KEELEY; RUNDEL, 2003).

## **2.2 Declínio na concentração atmosférica de $\text{CO}_2$ como condição promotora do surgimento da via C4**

Nos primeiros anos da história da Terra, eventos de vulcanismo mantiveram a atmosfera do planeta Terra com altas concentrações de  $\text{CO}_2$  (CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998), favorecendo o surgimento da via fotossintética ancestral, a C3, a cerca de 2900 Ma (FIGURA 1; SAGE, 2004; CHRISTIN; OSBORNE, 2013). Entretanto, o escoamento de  $\text{CO}_2$  para os oceanos e depósitos orgânicos, aumento da atividade fotossintética e intemperismo causaram a redução da concentração desse gás, na atmosfera, durante os últimos 65 Ma, que culminou no final da Era Cenozóica com valores médios de 180 ppm (CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998; ZACHOS et al., 2001). Acredita-se que os eventos tectônicos de colisão do subcontinente indiano com o continente asiático que resultaram na elevação do Himalaia foram

responsáveis por consumir elevadas quantidades de  $\text{CO}_2$  da atmosfera (CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998).

Figura 1 - Linha do tempo geológica apontando os principais eventos relacionados com o surgimento e a expansão C4. P, Paleogeno; N, Neogeno; Q, Quaternário. Tempo em milhões de anos atrás (Ma).



Assim, o declínio das concentrações de  $\text{CO}_2$  para valores abaixo do que é considerado limite para o funcionamento da via C3, foi tratado como o principal *driver* para o surgimento e a expansão de ecossistemas C4, modificando os padrões de flora e fauna (CERLING et al., 1997; CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998). Modelos de rendimento quântico de  $\text{CO}_2$  indicam que plantas C3 teriam maior desempenho quando comparadas às C4, uma vez que estas possuem gasto metabólico extra para a regeneração de fosfoenolpiruvato. Entretanto, em condições de elevadas temperaturas e baixas concentrações de  $\text{CO}_2$ , como são sugeridas para o final do Cenozóico (entre o final do Mioceno e o início do Plioceno), plantas C4 foram favorecidas, por conta do mecanismo concentrador de  $\text{CO}_2$ , responsável por suprimir a fotorrespiração (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997; CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998).

O Mioceno é considerado um período de mudanças-chave que levaram à era glacial do final do Cenozóico o que permitiu o surgimento da biota moderna (ZACHOS et al., 2001). Análises de isótopos de carbono relacionados com paleosolos e paleodietas indicam a rápida expansão e dominância de ecossistemas terrestres C4 em várias partes do mundo, no final do Mioceno e início do Plioceno, período compreendido entre 8 e 5 Ma (CERLING et al., 1999; TIPPLE; PAGGANI, 2007; OSBORNE, 2011). A reposição de florestas fechadas por áreas abertas foi acompanhada da modificação da fauna (CERLING et al., 1997; CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998), que hoje pode ser utilizada como registro fóssil para suporte de informações sobre os primeiros ecossistemas C4 do planeta Terra.

A mudança de vegetação ligada à da fauna está relacionada com o fato de que grande parte da proteína foliar de plantas C4 está localizada nas células da bainha, que possuem paredes celulares mais espessas, o que torna mais difícil o acesso ao conteúdo proteico quando comparado às plantas C3 (CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998), sustentando altos níveis de herbivoria presentes em ecossistemas C4 (HECKATHORN et al., 1999). No Paquistão, a dieta animal foi completamente modificada de C3 para C4 a 6 Ma, período referente ao aumento do número de poáceas C4 (CERLING et al., 1997). Já na América do Sul, a dieta C4 para animais passa a ser importante 7,6 Ma (CERLING et al., 1997).

Apesar de mais de 60% das plantas C4 estarem presentes em ambientes quentes como as savanas, os ciclos glacial-interglacial influenciaram a expansão/ contração dos ecossistemas C4 (EDWARDS et al., 2010), sendo isso bem relacionado com as baixas concentrações de CO<sub>2</sub>. As menores temperaturas das eras glaciais fizeram com que a evapotranspiração dos oceanos fosse reduzida, provocando o declínio do CO<sub>2</sub> atmosférico, que atingiu um mínimo de 180 ppm (CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998). Assim, os intervalos de tempo

mais frios da história da Terra, reduzem a fotorrespiração em plantas C3, porém são insuficientes para remediar os efeitos causados pelas baixas concentrações de CO<sub>2</sub>, sendo esperado o surgimento de plantas C4 durante as eras glaciais, mesmo em regiões atualmente tropicais (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997; CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998; OSBORNE, 2011). Existem evidências de que o último período glacial foi responsável pela expansão de ecossistemas C4 na África Central e no Leste desse continente, causando a retração da floresta (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997; CERLING; EHLERINGER; HARRIS, 1998).

Dessa maneira, de acordo com Cerling, Ehleringer e Harris (1998), a hipótese intitulada *CO<sub>2</sub> starvation* considera as baixas concentrações de CO<sub>2</sub> referentes ao período do final do Mioceno como o fator único e primário para o surgimento da via fotossintética C4, o que é ratificada pela expansão desses ecossistemas. Entretanto, não existem evidências concretas de que o Mioceno foi marcado por períodos prolongados de baixas concentrações de CO<sub>2</sub>, como sugerido por relatos geoquímicos (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999; PAGANI et al., 2005).

Atualmente, sabe-se que valores baixos de CO<sub>2</sub> existiram na atmosfera 10 Ma antes do período em que é registrada a expansão desses ecossistemas, durante o final do Oligoceno (OSBORNE, 2011). Da metade até o final do Eoceno (45- 33Ma), os valores de CO<sub>2</sub> na atmosfera eram em torno de 1500 ppm e decresceram até o Oligoceno (~ 180 ppm) (PAGANI et al., 2005). O declínio de CO<sub>2</sub>, durante o Oligoceno, que durou até a Revolução Industrial, criou um ambiente favorável ao surgimento da via C4 (PAGANI et al., 2005; CHRISTIN et al., 2008).

Com base em dados filogenéticos e moleculares, a origem C4 mais antiga é encontrada na subfamília Chloridoideae<sup>6</sup> e datada de 32-25 Ma (Oligoceno) que coincide com o declínio considerável de CO<sub>2</sub> (FIGURA 1; CHRISTIN et al., 2008). Assim, plantas C4 já poderiam existir no início do Neogeno, entretanto sua expansão coordenada com a mudança da fauna e inserção na dieta destes, somente ocorreu no final do Mioceno- início do Plioceno (8- 3 Ma), uma vez que as subseqüentes origens de plantas C4 continuam sendo datadas até 3- 2 Ma (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999; OSBORNE, 2011). Essas plantas, provavelmente, permaneceram raras e isoladas em ambientes extremos até encontrarem condições ambientais ideais para que pudessem dominar os biomas (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011; CHRISTIN et al., 2008; OSBORNE, 2011). Apesar do fóssil mais antigo de anatomia Kranz ser datado de 12,5 Ma, a ausência de registros anteriores pode ser explicada pelo fato dessas plantas crescerem em ambientes onde estão expostas a incêndios naturais, sendo oxidadas o que não favorece a preservação de matéria orgânica (CERLING, 1999; CHRISTIN et al., 2008).

Os valores de CO<sub>2</sub> (~320 ppm) registrados durante o Mioceno fazem com que haja um desacoplamento entre baixas concentrações de CO<sub>2</sub> e expansão de ecossistemas C4 (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999; PAGANI et al., 2005). Assumindo os modelos de fotossíntese, o surgimento da via C4 é favorecido pelas baixas concentrações de CO<sub>2</sub> do final do Oligoceno em relação à C3 (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999). Entretanto, por conta do intervalo entre o surgimento (final do Oligoceno) e expansão C4 (final do Mioceno), é possível que os baixos níveis de CO<sub>2</sub> não sejam o único fator responsável pelas modificações de flora e fauna (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999), suportando a hipótese de que outras mudanças climáticas

---

<sup>6</sup> Subfamília de poáceas incluída no clado PACMAD, onde se encontram classificadas todas as poáceas C4.

mundiais tenham favorecido a expansão e diversificação C4 (CHRISTIN et al., 2008).

### **2.3 O estabelecimento de forte sazonalidade influenciou a expansão e a dominância de ecossistemas C4**

A expansão de ecossistemas C4 ocorreu predominantemente no final do Mioceno e início do Plioceno, em diferentes ritmos, sem possuir necessariamente uma sincronia global (EDWARDS; STILL, 2008). O declínio de CO<sub>2</sub> pode ter sido responsável por selecionar as primeiras linhagens de plantas C4 (KEELEY; RUNDEL, 2003), porém, durante o Mioceno, as concentrações de CO<sub>2</sub> variaram de 200 a 460 ppm, sendo apenas a variação desse fator insuficiente para modificar paisagens inteiras (WU et al., 2014). Assim, as linhagens C4 já existentes parecem ter sido mais responsivas às mudanças de clima específicas de cada região do que à concentração de CO<sub>2</sub> (EDWARDS et al., 2010; STRÖMBERG, 2011; WU et al., 2014), sendo as reais causas ainda controversas (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999). Diversas hipóteses paleoclimáticas tentam explicar quais condições foram responsáveis pela ampliação das áreas ocupadas por esses ecossistemas (OSBORNE, 2008).

As plantas C4 possuem maior eficiência do uso da água e nutrientes, além de alta capacidade fotossintética, mesmo sob elevadas temperaturas. Entretanto, apesar das diferenças entre C3 e C4 serem essenciais, é pouco provável que apenas fatores ligados à fisiologia foliar sejam responsáveis por promover a expansão desses ecossistemas (EDWARDS et al., 2001; SCHEITER et al., 2012). É provável que o aumento do número de plantas C4 no final do Mioceno esteja ligado ao estabelecimento de regimes paleoclimáticos sazonais e à perda de cobertura florestal (OSBORNE; BEERLING, 2006), que ocorreram tanto em áreas tropicais quanto em temperadas (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999). Assim, a expansão C4 foi dirigida por fatores, como



herbivoria, fogo, topografia, biodiversidade, deposição de sedimentos (CHEN et al., 2015) que, em conjunto com condições climáticas regionais, desencadearam o aparecimento e a dominância dessa vegetação (HUANG et al., 2001; ZACHOS et al., 2001; WU et al., 2014).

O aparecimento de paisagens dominadas por poáceas C4 é datado de aproximadamente 7,7 Ma no Paquistão, 7,0 Ma no Nepal e 6,0 Ma no norte da Índia (OSBORNE; BEERLING, 2006). Em algumas regiões, a expansão desses ecossistemas parece ter sido favorecida por condições de limitação hídrica e aumento de temperatura, como no caso do Nepal onde houve uma redução na quantidade de chuvas, entre 8 e 3 Ma (WU et al., 2014). O aumento da frequência de estações secas provocou a morte de muitas árvores, favorecendo a invasão de poáceas C4 (OSBORNE, 2008). Nesse caso, a aridez seria considerada um *driver* que favoreceria as plantas C4 em locais com suprimento hídrico limitado, por estas possuírem maior eficiência do uso da água (WU et al., 2014).

Por outro lado, no subcontinente indiano, poáceas C4 foram favorecidas pelo aumento de uma estação chuvosa e quente (HUANG et al., 2001), condição que se estabeleceu na Ásia no final do Mioceno (7,5 Ma), por conta da intensificação do clima de monções (ZACHOS et al., 2001; WU et al., 2014). O clima de monções apresenta um verão úmido e quente e um inverno frio e seco, sendo que essa sazonalidade marcada pode ter sido responsável pelo estabelecimento de pastagens naturais e retração florestal (ZHISHENG et al., 2005; OSBORNE; BEERLING, 2006). Já na parte leste da Ásia, a biomassa C4 do final do Mioceno possui forte relação com o incremento da temperatura e da precipitação durante a estação quente (ZHISHENG et al., 2005). Nessa região, a manutenção da vegetação C4 a 2,6 Ma, é relacionada com o aumento dos eventos de queimadas, em conjunto com aridez e sazonalidade (ZHOU et al., 2014).

Sugere-se que, no início e metade do Mioceno, as paisagens fossem ocupadas por um mosaico floresta-pastagem (STRÖMBERG, 2011), o que foi mantido pela ausência de eventos de fogo, atrasando a expansão de ecossistemas inteiramente dominados por poáceas C4 (SCHEITER et al., 2012). O fogo modifica a aridez e, conseqüentemente, a distribuição vegetacional, resultando na substituição de ambientes florestais por pastagens (LUNT et al., 2007; SCHEITER et al., 2012). A presença de eventos de queimadas aliada a forte sazonalidade pode explicar a expansão C4 em algumas partes do mundo à custa de árvores e outras plantas C3, bem como sua manutenção até os dias atuais (KEELEY; RUNDEL, 2005; LUNT et al., 2007; KIM et al., 2016).

Evidências de depósitos de carvão em sedimentos marinhos no Oceano Pacífico (KEELEY; RUNDEL, 2005) e estudos de modelagem vegetacional na África (SCHEITER et al., 2012) suportam a ideia da ocorrência de queimadas no final do Mioceno. Acredita-se que, nesse período, o clima tenha se tornado mais sazonal, com a delimitação de duas estações na qual uma era úmida e altamente produtiva, com acúmulo de biomassa para queimadas, e a outra era seca e com a vegetação sujeita à combustão (KEELEY; RUNDEL, 2003; EDWARDS et al., 2010; HOETZEL et al., 2013). O *feedback* para a aridez e o fogo é criado pela redução da quantidade de chuvas, uma vez que a transpiração em poáceas é menor que a de árvores (BEERLING; OSBORNE, 2006), além do fato de que poáceas são menos eficientes em reciclar umidade (HOETZEL et al., 2013). Assim, a presença de um ambiente altamente inflamável diminui a quantidade de árvores, criando áreas abertas, com mais radiação e maiores temperaturas, promovendo a invasão de poáceas C4 (LUNT et al., 2007; SCHEITER et al., 2012).

De acordo com Beerling e Osborne (2006), uma vez iniciado o processo de deterioração florestal, é inevitável que essa área se torne uma savana, sugerindo-se que a hipótese de *feedback* fogo-climática explique a rápida

transformação de florestas em savanas C4 no “Velho Mundo”<sup>7</sup> durante o Mioceno. Entretanto, esse cenário não foi observado em todas as partes do mundo durante o final do Mioceno, uma vez que algumas regiões ainda não possuíam estações bem definidas (KEELEY; RUNDEL, 2005). As diferenças nos padrões de estabelecimento de pastagens, ao redor do mundo, mesmo em latitudes similares, corroboram com a ideia de que condições climáticas locais são os principais fatores relacionados com o surgimento de ecossistemas abertos e da dominância C4 (EDWARDS et al., 2010; STRÖMBERG, 2011).

O estabelecimento de biomas C4 na América do Sul foi mais complexo que em outras partes do mundo (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999), pois apesar de áreas C4 somente surgirem a partir do final do Mioceno (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999; STRÖMBERG, 2011), já existiam áreas abertas dominadas por poáceas C3 antes desse período. De um modo geral, as poáceas C3 dominaram até metade do Mioceno, seguidas por uma vegetação com padrão misto C3 e C4 (LATORRE; QUADE; MCINTOSH, 1997; KIM et al., 2016). Já a expansão C4, mesmo esta já estando presente a 16,7 Ma (STRÖMBERG, 2011), foi gradual durante o final do Mioceno até metade do Plioceno (3,5 Ma), com pico apenas 4 Ma (LATORRE; QUADE; MCINTOSH, 1997; LE ROUX et al., 2012; KIM et al., 2016). Nesse período, na América do Sul, as áreas abertas passam a ser dominadas por quase 70% de vegetação C4 (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999).

No início do Mioceno, já existia um número significativo de representantes Pooideae<sup>8</sup> e PACMAD<sup>9</sup> na formação Sarmiento, confirmando a

---

<sup>7</sup> Termo generalizado que define a parte do mundo que inclui os continentes Europa, Ásia e África.

<sup>8</sup> Subfamília de poáceas inclusas no clado BEP, onde não se observa evolução da fotossíntese C4.

<sup>9</sup> Clado de poáceas onde se encontram diversas transições entre a via C3 e a C4.

ideia de que a diversificação taxonômica desses clados<sup>10</sup> em áreas abertas na América do Sul ocorreu pelo menos a 20 Ma (STRÖMBERG et al., 2013). Depois do Mioceno, a dieta C4 passou a ser parte essencial na dieta de herbívoros localizados em latitudes menores, além de que as poáceas C4 passaram a ser características de regiões tropicais e subtropicais, enquanto as C3 ficaram, em sua maioria, confinadas em regiões temperadas e mais próximas aos polos (MACFADDEN et al., 1999; BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012). Isso mostra que plantas C4 requerem um mínimo de temperatura e irradiância para dominar os ambientes (BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012).

Uma vez estabelecidas as áreas abertas, é provável que, na América do Sul, a expansão C4 tenha sido dirigida por sazonalidade, eventos de queimadas e aridez (KIM et al., 2016), sendo essas condições ambientais também responsáveis pelo favorecimento C4 em relação às poáceas C3, por conta das vantagens fisiológicas (SCHEITER et al., 2012). No norte da Argentina, durante o final do Mioceno, parte da cordilheira dos Andes estava se formando, o que, possivelmente, modificou o clima, regime de chuvas e, em consequência, favoreceu a expansão C4, bem como suas variações em abundância (LE ROUX, 2012; COTTON; HYLAND; SHELDON, 2014). Na transição do Mioceno para o Plioceno, as temperaturas se tornaram mais elevadas e a média de pluviosidade caiu para menos de 500 mm (LE ROUX, 2012), o que auxiliou no estabelecimento de um clima mais sazonal, com verão chuvoso e inverno seco, similar ao clima de monções asiáticas (COTTON; HYLAND; SHELDON, 2014).

A maior expansão de plantas C4, na América do Sul, ocorreu durante o Plioceno e início do Pleistoceno e pode ter sido afetada pela diminuição da temperatura do oceano, que controla a umidade do ar e, conseqüentemente, a aridez (KIM et al., 2016). O aumento da aridez, além de se relacionar com a

---

<sup>10</sup> Grupo de organismos originados de um único ancestral comum

expansão de inúmeros ecossistemas C4 pelo mundo (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999), favorece o aumento do número de eventos de queimadas bem característicos do surgimento desse tipo de vegetação (EDWARDS et al., 2010; COTTON; HYLAND; SHELDON, 2014; KIM et al., 2016). Desde 11 Ma, uma série de eventos de queimadas tem sido registradas na América do Sul, sendo estes sempre seguidos da dominância dos ambientes por espécies C4 (KIM et al., 2016). Assim, apesar da necessidade de mais estudos para entender o quão rápido as linhagens C4 transformaram o ambiente, especialmente nos trópicos, sabe-se que essa expansão foi, principalmente, promovida pelo estabelecimento de sazonalidade climática e eventos de queimadas (SIMON et al., 2009). Entretanto, o fato de algumas áreas somente se tornarem dominadas por C4 no Pleistoceno mostra a falta de sincronia desse fenômeno em nível mundial.

#### **2.4 Poáceas C4 são típicas de ambientes tropicais e subtropicais**

O registro mais antigo de poácea foi encontrado na África e América do Sul durante o Paleoceno entre 60 e 55 Ma (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999), entretanto a sua diversificação é um evento mais recente na história da Terra. Os maiores eventos de expansão de ecossistemas C4 ocorreram entre o final do Mioceno e o início do Plioceno, em diferentes áreas tropicais e subtropicais do planeta (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997), sendo estes relacionados, principalmente, com a intensificação da sazonalidade (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999). A via C4 possui mais de 62 origens independentes em plantas superiores, existindo cerca de 7500 espécies C4 distribuídas em 19 famílias de poáceas, ciperáceas e eudicotiledôneas (SAGE, 2004; SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011; SAGE, 2016).

Embora exista uma média de 1700 espécies eudicotiledôneas C4, as monocotiledôneas C4 representam uma porção maior, sendo conhecidas 4600 espécies poáceas C4 (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997; SAGE;

LI; MONSON, 1999; SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011). Dessa forma, a expansão e dominância da via C4, muitas vezes se confunde com o surgimento de áreas de pastagens e poáceas C4. Enquanto diversos *drivers* ambientais (sazonalidade, aridez e queimadas) foram responsáveis pela expansão de poáceas C4, em algumas eudicotiledôneas esse processo parece estar relacionado com salinidade, como nas linhagens de Chenopodiaceae (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011) e com a combinação entre aumento da aridez e baixa concentração de CO<sub>2</sub> relativos aos períodos glaciais (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997). O fato de esses períodos de tempo serem muito mais curtos (20000 à 30000 anos) na história da Terra, explica a menor abundância de eudicotiledôneas em relação à monocotiledôneas C4 (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997).

No total, o número de espécies C4 representa apenas 3% das plantas terrestres (SAGE; STATA, 2015), entretanto são capazes de dominar biomas inteiros, como savanas, chegando a cobrir mais de 35% da superfície da Terra (SAGE; WEDIN; LI, 1999; STRÖMBERG, 2011). As poáceas C4 concentram-se em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes, localizadas em médias e baixas latitudes e altitudes, sendo a presença dessa via fotossintética uma facilitadora para essa distribuição (SAGE; WEDIN; LI, 1999; EDWARDS et al., 2010). Esse padrão reflete as vantagens fisiológicas que plantas C4 possuem sobre C3, em regiões quentes e áridas (SAGE; WEDIN; LI, 1999; LUNT et al., 2007).

A distribuição de poáceas C4 se relaciona com a temperatura, sendo que estas possuem o requerimento de uma estação de crescimento quente e rápida e acesso a radiação (PAGANI; FREEMAN; ARTHUR, 1999; SAGE; WEDIN; LI, 1999; EDWARDS; STILL, 2008; BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012). Uma provável explicação para essa relação é que muitas linhagens C4 já estariam pré-adaptadas a ambientes quentes (EDWARDS; STILL, 2008). Assim,

em baixas temperaturas as poáceas C4 são quase inexistentes, entretanto acima de 20°C, por mais que exista sobreposição de poáceas C3 e C4, as primeiras ocupam regiões de sub-bosque e as C4 ocupam locais abertos de alta irradiância (BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012). Se existentes em locais com invernos rigorosos, plantas C4 sobrevivem em estado de dormência (SAGE; WEDIN; LI, 1999). Assim, a diversificação para ambientes frios é rara, sustentando a ideia de que poáceas C4 possuem um conservadorismo tropical<sup>11</sup> (EDWARDS; SMITH, 2010).

Há diminuição considerável da abundância de poáceas C4 acima de 2500 m de altitude e quase total ausência acima de 4000 m de altitude (BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012). As poucas poáceas C4 que ocupam regiões elevadas, como exemplo, nos Andes, podem estar relacionadas com condições microclimáticas específicas de altas temperaturas (BREMOND; BOOM; FAVIER, 2012). Como as baixas e médias latitudes também podem ser ocupadas por florestas, uma das principais interações que afeta a distribuição C4 é a competição entre estas e espécies arbóreas C3 (EDWARDS et al., 2010; BOND; MIDGLEY, 2012). Assim, a expansão de ambientes ocupados por poáceas C4 é diretamente dependente da retração florestal (BOND; MIDGLEY, 2012). Uma vez que as maiores áreas de pastagens C4 ocorrem em locais com altas taxas de queimadas (BOND; MIDGLEY, 2012), existe limitação do recrutamento de espécies arbóreas (EDWARDS et al., 2010).

As poáceas C4 possuem alta taxa de crescimento, durante a estação chuvosa e a baixa taxa de decomposição foliar que favorece o acúmulo de biomassa para as queimadas (BOND, 2008). Essas plantas possuem reservas e meristemas protegidos abaixo do solo, além de rebrotarem rapidamente após

---

<sup>11</sup> Hipótese gerada a partir da observação de que somente poucas linhagens teriam se diversificado fora dos trópicos, pelo fato de que baixa temperatura é uma das barreiras mais difíceis para o desenvolvimento e estabelecimento de organismos (revisado por EDWARDS; SMITH, 2010).

desfolha causada pelo fogo (BOND, 2008; SAGE, STATA, 2015). Por estar em ambientes geralmente mais quentes e com limitação de suprimento hídrico, a alta eficiência do uso da água permite sua distribuição nesses locais (OSBORNE, 2008; EDWARDS et al., 2010) e isso limita o estabelecimento de árvores (EDWARDS; SMITH, 2010). Além disso, poáceas C4 possuem sistema radicular mais fibroso que permite explorar o solo de maneira mais intensa do que raízes pivotantes de árvores (BOND, 2008).

A América do Sul possui uma variação topográfica e condições climáticas que permitem o estabelecimento de ecossistemas dominados por poáceas C4 (JACOBS; KINGSTON; JACOBS, 1999), sendo as savanas do Cerrado brasileiro compostas por mais de 20% de poáceas C4 (SAGE; WEDIN; LI, 1999). Nessas paisagens, há presença de algumas árvores e arbustos, embora as poáceas C4 dominem o estrato herbáceo (BOND; MIDGLEY, 2012), existindo uma ligação entre a evolução de linhagens C4 e o estabelecimento desse bioma (EDWARDS; SMITH, 2010). Essa região do mundo é considerada o *hotspot* de transições C3- C4 inclusas na tribo Paniceae<sup>12</sup> (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011).

A Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados da Bahia e Minas Gerais, possui paisagens de campo rupestre<sup>13</sup> e a quantidade de poáceas C4 chega até 84% (GARCIA et al., 2009), com 198 espécies catalogadas na família Poaceae (SILVEIRA et al., 2016). A presença desse tipo de vegetação, nessa área, corrobora a ideia que relaciona condições abióticas com distribuição C4. Áreas de campo rupestre possuem uma sazonalidade com invernos secos e verões chuvosos, além de solos pobres em nutrientes e com elevadas concentrações de alumínio (SILVEIRA et al., 2016). Assim, a distribuição C4 é em grande parte determinada pelo tipo de vantagem competitiva que essa via fotossintética pode

---

<sup>12</sup> Tribo pertencente à subfamília Panicoideae do clado PACMAD.

<sup>13</sup> Mosaico de pastagens associado com afloramentos rochosos (SILVEIRA et al., 2016).



oferecer em um determinado ambiente, sendo que essas plantas são, predominantemente, favorecidas por estações quentes, em especial se há seca e o fogo se tornarem comuns (EDWARDS et al., 2010; SAGE, 2016).

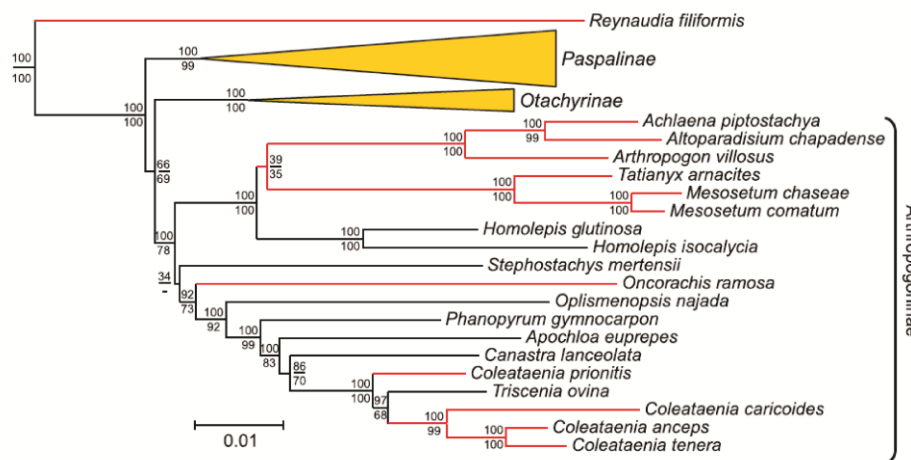
### **2.5 As poáceas C4 são classificadas no grupo PACMAD possuindo pontos intermediários entre as duas vias fotossintéticas**

A história evolutiva de poáceas é complexa por causa do alto nível de polimorfismo entre as famílias, em termos de vias metabólicas, estruturas morfológicas e distribuição geográfica (BOUCHENAK-KHELLADI et al., 2010). A família Poaceae possui mais de 11 mil espécies divididas em alguns dos clados mais importantes das plantas vasculares, além de ser caracterizada como o maior ecossistema terrestre (STRÖMBERG, 2011; JONES; BURKE; DUVALL, 2014). Esta é dividida em três subfamílias bastante divergentes Puelioideae, Pharoideae e Anomochloideae, distribuídas de forma esparsa em ambientes florestais (GPWG II, 2012; JONES; BURKE; DUVALL, 2014), e a maioria das famílias classificadas em dois clados BEP e PACMAD (GPWG II, 2012). O clado BEP (Bambusoideae; Ehrhartoideae e Pooideae) é formado exclusivamente por espécies C3, enquanto o PACMAD (Panicoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Aristidoideae e Danthonioideae) possui tanto espécies C3 quanto C4 (GPWG II, 2012), onde a via C4 evoluiu múltiplas vezes em mais de 20 origens distintas (CHRISTIN et al., 2008; CHRISTIN et al. 2012; SAGE, 2016).

Das origens do PACMAD, 15 ocorrem na subfamília Panicoideae, maior linhagem dentro do clado (EDWARDS; SMITH, 2010). Essa subfamília possui 11 tribos, dentre elas a Paniceae, que se divide em duas subtribos com base no número de cromossomos,  $x=9$  (subtribo Paniceae) e  $x=10$  (subtribo Paspaleae) (MORRONE et al., 2012). De acordo com essa classificação, dentro de Paspaleae está inclusa a subtribo Arthropogoninae, que inclui gêneros com

variações morfológicas, anatômicas e fisiológicas (FIGURA 2; GIUSSANI et al., 2001). Essa subtribo possui vários gêneros distribuídos na América do Sul, com um elevado número de transições entre as vias C3 e C4 (GPWG II, 2012). Essa evolução recorrente de fotossíntese C4 em poáceas apresenta-se como uma oportunidade para diversas variações, uma vez que cada surgimento ocorreu com condições internas e externas únicas, sendo necessário entender como as características dessa via se integraram em cada um desses organismos (EDWARDS et al., 2010).

Figura 2 - Filogenia da subtribo Arthropogoninae mostrando os pontos de surgimento da via C4 (representados pelas linhas vermelhas).  
Fonte: Grass Phylogeny Working Group II (GPWG II, 2012).



O agrupamento de origens C<sub>4</sub> no PACMAD indica que determinadas linhagens possuem características facilitadoras da evolução dessa via fotossintética, que podem ser identificadas por padrões que estão estritamente relacionados entre os grupos C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> dentro de um mesmo clado filogenético (GPWG II, 2012; CHRISTIN et al., 2013b). A existência de caracteres anatômicos ‘tipo C<sub>4</sub>’ no ancestral comum das espécies PACMAD permitiu que

esse clado pudesse recorrer à evolução dessa via (CHRISTIN et al., 2013a). Acredita-se que alguns genes já estavam presentes nos ancestrais de poáceas C4 e foram passados para a maioria dos descendentes (CHRISTIN et al., 2013b; CHRISTIN et al., 2015). A partir disso, alguns genes fazem a coopção de realizar funções relacionadas à via C4 e isso pode ocorrer múltiplas vezes (CHRISTIN et al., 2013b; CHRISTIN et al., 2015).

A coopção deve ter sido preferencial para genes que já codificavam proteínas com cinéticas similares ao “tipo C4”, o que diminui a quantidade de mutações requeridas (CHRISTIN et al., 2015). Uma vez que os genes estão ativamente envolvidos na atividade da via C4, a seleção natural é capaz de atuar a fim de aumentar a eficiência do ciclo, por meio de múltiplas modificações em relação à expressão de enzimas e a suas propriedades catalíticas (HECKMANN et al., 2013; CHRISTIN et al., 2015). Cada enzima se adapta à via C4, gerando isoformas que tenham expressão e localização celular e subcelular do tipo C4 (CHRISTIN et al., 2015).

Entretanto, essa transição entre as vias C3 e C4 não ocorre de forma abrupta de modo que é possível identificar etapas intermediárias estáveis que são estabelecidas anteriormente ao aparecimento completo da via C4 (CHRISTIN et al., 2013a; SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Em plantas intermediárias, apesar das células da bainha possuírem organização similar à anatomia Kranz, as células do mesofilo não formam uma camada concêntrica ao redor das células da bainha, como é observado em plantas C4 (MONSON; RAWSTHORNE, 2000). Porém, essa organização auxilia na redução da distância entre os feixes vasculares, bem como no aumento da densidade de feixes vasculares, facilitando a ocorrência de mecanismo concentrador de carbono (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). A presença dessas características já em espécies C3 e intermediárias seriam consideradas pré-condições para o surgimento da via C4 (GOWIK; WESTHOFF, 2011).

A maior modificação é relativa ao engajamento das células da bainha na atividade fotossintética. Em uma etapa intermediária inicial, pode-se perceber que estas já começam a aumentar a quantidade de organelas em relação às espécies C3 (SAGE; STATA, 2015), sendo esse tipo de espécie chamada de C3 proto-Kranz (MUHAIDAT et al., 2011). As células do mesofilo e da bainha operam de forma independente, sendo que a expressão GDC ocorre em ambos os tipos celulares (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Numa etapa subsequente, se estabelece um mecanismo rudimentar de concentração de carbono, que é chamado de fotossíntese C2, onde a metabolização da glicina é limitada às células da bainha (EDWARDS, 2014). Nesse caso, o termo C2 se refere ao número de carbono da molécula de glicina que é transportada da célula do mesofilo para a célula da bainha (SAGE; STATA, 2015).

As espécies C2 podem ser classificadas em tipo I, em que o transporte de glicina funciona sozinho, concentrando CO<sub>2</sub> na célula da bainha ou tipo II, em que o ciclo C2 é acompanhado por um modesto ciclo C4 (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Depois de C2, a etapa seguinte dessa evolução seriam as plantas que exibem caracteres *C4-like*, onde apesar de já haver modificações que as aproximam do tipo C4, incluindo a compartimentalização enzimática, a atividade exclusiva da Rubisco na célula da bainha é incompleta (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012; SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Dessa forma, essas etapas visam à ativação das células da bainha e compartimentalização enzimática, de modo que na medida em que mais caracteres vão sendo incorporados, a transição para a via C4 se torna mais fácil (EDWARDS et al., 2010; SAGE; STATA, 2015).

## **2.6 O conhecimento sobre como as espécies intermediárias medeiam a transição entre as vias C3 e C4 pode auxiliar no aumento do rendimento em culturas C3**

A via C4, apesar de estar presente em apenas 3% do total de espécies terrestres, é responsável por aproximadamente 25% da produtividade primária global (EDWARDS et al., 2010; SAGE; ZHU, 2011). No contexto das mudanças climáticas, o aumento de temperatura e dos períodos de seca podem afetar a produção de culturas e, conseqüentemente, a segurança alimentar (CONNOLLY-BOUTIN; SMIT, 2016; KORRES et al., 2016). Embora o aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico promova incremento das taxas fotossintéticas, esse cenário associado ao aumento de temperatura é responsável por diminuir a produtividade de culturas C3, como exemplo o arroz (*Oryza sativa*)<sup>14</sup> (WANG et al., 2016). Assim, uma possível solução para aumentar o rendimento de culturas C3, que se trata da via fotossintética utilizada pela maioria das culturas, seria inserir a via C4, utilizando o subtipo NADP-ME (MERTZ; BRUTNELL, 2014; SAGE; ZHU, 2011; VON CAEMMERER; QUICK; FURBANK, 2012).

Modelos 3D de conexão entre as células do mesófilo e da bainha em arroz mostram que a integração entre os dois ciclos aumentaria as taxas de fotossíntese sob as condições atuais de CO<sub>2</sub> atmosférico (WANG; THOLEN; ZHU, 2017). As diversas origens C4, bem como a facilitação de surgimento em alguns grupos na natureza são evidências de que essa inserção de vias seria direta e possível (SAGE; ZHU, 2011; SCHULER; MANTEGAZZA; WEBER, 2016). Para isso, fazem-se necessários estudos que envolvam grupos onde essa via surgiu, considerando as espécies intermediárias que fornecerão modelos, a por meio dos quais pode-se obter informações em relação ao desenvolvimento vascular, bem como a rede regulatória de genes, possibilitando ajustes finos

---

<sup>14</sup> Classificada na tribo Oryzeae, subfamília Ehrhartoideae pertencentes ao clado BEP (GPWG II, 2012).

anatômicos e bioquímicos (SCHULER; MANTEGAZZA; WEBER, 2016; VON CAEMMERER; QUICK; FURBANK, 2012).

Como consequência do número reduzido de espécies intermediárias para monocotiledôneas, o conhecimento sobre o tema é restrito a clados de eudicotiledôneas (KHOSHRAVESH et al., 2016). O atual organismo modelo de evolução da via C4 é *Flaveria*, entretanto por ser uma eudicotiledônea pode ter uma utilidade limitada para poáceas como é o caso do arroz (SAGE; ZHU, 2011; SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Diferente de outros grupos que perdem espécies C4 relacionadas como *Steinchisma* e *Parthenium* (LUNDGREN et al., 2015), o gênero “não C4” *Homolepis* não perde espécies C4 filogeneticamente relacionadas, sendo o clado *Homolepis/Mesosetum* um forte candidato para estudos de evolução C4 (GPWG II, 2012). Se a inserção da via C4 em plantas C3 for bem sucedida, isso pode representar um avanço na solução de desafios referentes ao aumento da produção de alimentos e bioenergia, além de diminuir a pressão por tornar áreas florestais e outros habitats naturais em locais para cultivos (SAGE; ZHU, 2011).



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Mapas de Distribuição Ambiental

Realizou-se um levantamento dos registros de coletas realizadas no Brasil para as espécies da subtribo Arthropogoninae no [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org) e [www.splink.org.br](http://www.splink.org.br), definindo coordenadas geográficas para cada uma das espécies. Para os fatores ambientais considerou-se altitude (m), temperatura mínima, média e máxima (°C), *Fine Fuel Moisture Code* (FFMC; VAN VAGNER, 1987) e Índice de Nesterov (NI; NESTEROV, 1949). O FFMC indica o potencial de queimada enquanto NI o potencial de seca. Os dados foram trabalhados em projeção geográfica latitude/longitude e DATUM=WGS84 na resolução de 0,5° (~50 km), exceto para altitude em que a resolução foi de 90 m (<http://srtm.csi.cgiar.org/>).

A partir disso, calculou-se a mediana de latitude e longitude para os gêneros “não C4”- *Apochloa*, *Canastra*, *Oplismenopsis*, *Stephostachy* e *Homolepis* e C4- *Altoparadisium*, *Arthropogon*, *Coleataenia*, *Cyphonanthus*, *Keratochlaena*, *Mesosetum*, *Oncorachis* e *Tatianyx* e, separadamente, para as espécies *H. aturensis*, *H. glutinosa*, *H. isocalyca*, *H. villaricensis*, *M. loliiforme* e *M. ferrugineum*. Essas medianas de ocorrência de cada gênero/espécie com os valores de 25°- 75° percentil foram relacionados com os fatores do ambiente já citados. Adicionalmente, geraram-se gráficos relacionando esses fatores com a distribuição geográfica das espécies.

#### 3.2 Material Vegetal

Fragmentos foliares de material herborizado de espécies da subtribo Arthropogoninae (TABELA 1, ANEXO A) foram coletados no New York Botanical Garden (NYBG). Foram coletados rizomas das espécies *Apochloa euprepes* (Renvoize) Zuloaga & Morrone, *Apochloa poliophylla* (Renvoize & Zuloaga) Zuloaga & Morrone, *Homolepis glutinosa* (Sw.) Zuloaga & Soderstr.,



*Homolepis isocalyca* (G. Mey.) Chase, *Homolepis longispicula* (Döll) Chase, *Mesosetum ferrugineum* (Trin.) Chase e *Mesosetum loliiforme* (Hochst. ex Steud.) Chase em diferentes áreas da Serra do Cipó, Brasil (TABELA 2, ANEXO). Já as plantas de *Homolepis aturensis* (Kunth) Chase, foram obtidas a partir de sementes provenientes da Costa Rica (TABELA 2, ANEXO).

As plantas de *H. isocalyca*, *H. aturensis* e *Mesosetum ferrugineum* foram cultivadas em câmara de crescimento (Conviron Ltda, Winnipeg, Canadá) na Universidade de Toronto, com temperaturas médias de 30°C/24°C (dia/noite), fotoperíodo de 14 horas e densidade de fluxo de fótons de 500  $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ . Uma vez por semana, realizou-se a fertilização com *Miracle Grow Evergreen Food* (30-10-20), suplementados com Ca, Mg e Fe-EDDHA. As plantas de *A. euprepes*, *A. poliophylla*, *H. glutinosa*, *H. longispicula* e *M. loliiforme* foram cultivadas em casa de vegetação, no Setor Experimental da Universidade Federal de Lavras, onde a densidade do fluxo de fótons ultrapassou 1200  $\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$  em dias ensolarados, sendo fertilizadas uma vez por mês. Durante o período experimental, todas as plantas foram mantidas em potes de 10 L irrigadas diariamente para evitar déficit hídrico.

O motivo para a diminuição do número de espécies ao longo das análises realizadas foi decorrente das dificuldades referentes ao transporte das espécies do Brasil para o Canadá e ao cultivo dos rizomas, situações que causaram a morte de algumas delas.

### **3.3 Composição isotópica de carbono em matéria seca**

Dos fragmentos foliares coletados de material herborizado (TABELA 1, ANEXO), cerca de 2 mg foram enviados para o Laboratório de Biotecnologia e Bioanálises da Universidade Estadual de Washington, para a determinação da relação isotópica de carbono (SAGE et al., 2007).

### 3.4 Anatomia foliar, ultraestrutura e imunomarcção enzimática

O material herborizado (TABELA 1, ANEXO) também foi utilizado para análise da anatomia foliar. Cerca de 10 g de tecido das espécies “tipo C3”- *H. villaricensis*, *A. cipoensis*, *A. molinioides*, *C. laceolata*, *O. najada*, *P. gymnocarpum* e “tipo C4”- *A. piptostachya*, *A. xerachne*, *C. anceps*, *O. macranta*, *O. ramosa* e *T. arnacites* foram reidratados, fixados, emblocados e seccionados para a obtenção de secções transversais para análises anatômicas (CHRISTIN et al., 2011). As imagens foram utilizadas para determinar a distância entre dois feixes vasculares ( $\mu\text{m}$ ) (partindo do meio de cada feixe). Por se tratar de amostras antigas, realizou-se uma comparação entre amostras de *H. glutinosa* e *H. aturensis* provenientes de material herborizado e de plantas cultivadas, sendo isso utilizado como padrão para confirmar as informações obtidas a partir do que foi reidratado (FIGURAS 1 e 2, ANEXO).

Realizou-se coleta da primeira folha recentemente expandida para análises de anatomia, ultraestrutura e imunomarcção enzimática entre 9h e 11 h, utilizando um total de três indivíduos por espécie. O tecido proveniente da região mediana da folha foi fixado com paraformaldeído 1%, glutaraldeído 1% e tampão cacodilato de sódio 0,05M, sendo, em seguida, desidratado e emblocado em *London Resin White* (LRWhite). Para as análises de anatomia foliar, realizaram-se cortes transversais de 2-3  $\mu\text{m}$  de espessura para as espécies *A. euprepes* (C3), *A. poliophylla* (C3), *H. glutinosa* (C3), *H. isocalycia* (intermediária), *H. aturensis* (intermediária)<sup>15</sup>, *H. longispicula* (intermediária), *M. ferrugineum* (C4) e *M. loliiforme* (C4) que foram corados com azul de toluidina 1%. Para cada um dos três indivíduos, utilizaram-se três secções, a partir do qual se obtiveram quatro imagens, totalizando 36 imagens por espécie. As imagens foram utilizadas para determinar a distância ( $\mu\text{m}$ ) e número de

---

<sup>15</sup> Os dados de anatomia foliar, ultraestrutura e imunomarcção enzimática para *H. aturensis* foram cedidos por Khoshravesh, R.

células entre dois feixes vasculares, área coberta por células da bainha do feixe vascular (BFV), área coberta por células do mesofilo (M), razão células do mesofilo: células da bainha do feixe vascular (M:BFV). As porcentagens de BFV e M foram determinadas, adicionando uma camada de pontos randomizados sob as imagens, a partir do qual se realizou a contagem dos locais onde os pontos marcavam as secções foliares (MCKNOWN; DENGLER, 2007).

Para a análise de ultraestrutura utilizaram-se amostras ultrafinas 0,4-0,6  $\mu\text{m}$  das espécies *A. euprepes*, *A. poliophylla*, *H. isocalycia*, *H. aturensis* e *M. ferrugineum*. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo. Para cada uma dos três indivíduos (uma folha de cada indivíduo), foram realizadas a quantificação de dez células BFV e dez células M, totalizando 60 imagens de células por espécie. As imagens das células BFV e M foram utilizadas para determinar área celular ( $\mu\text{m}^2$ ), espessura da parede celular ( $\mu\text{m}$ ), área planar de mitocôndrias/área celular (%), número de mitocôndrias/área celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ), área planar de peroxissomos/área celular (%), número de peroxissomos/área celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ), área planar de cloroplastos/área celular (%), número de cloroplastos/área celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ). Já as medidas de cloroplastos associados com a porção interna da parede celular (%), mitocôndrias associadas com a porção interna da parede celular (%), peroxissomos associados à porção interna da parede celular (%), cloroplastos cobrindo com a porção interna da parede celular (%), mitocôndrias cobrindo com a porção interna da parede celular (%), peroxissomos cobrindo à porção interna da parede celular (%) foram determinadas apenas para as células BFV.

As mesmas amostras ultrafinas, a mesma quantidade de células e as mesmas espécies das análises ultraestruturais foram utilizadas nas análises de imunomarcacão para as enzimas GDC, Rubisco e PEPc (para a espécie C4). A fim de evitar marcação de sítios não específicos todas as amostras foram bloqueadas com tampão salino Tris-Tween-20 e albumina de soro bovino 4%

(BSA/ pH 7,2) por 30 minutos. Para GDC realizou-se a incubação com anticorpo primário anti-GDC-P (1:50 diluído em tampão e BSA 1%) por 3h e em anticorpo secundário (18 nm *anti-rabbit IgC gold conjugated*) (1:20 diluído em tampão e BSA 1%) por 1h. Para Rubisco, a incubação foi realizada com anti-Rubisco (1:50 diluído em tampão e BSA 1%) por 3 h e para PEPC com anti-PEPc (1:200 diluído em tampão e BSA 1%) por 1 h. As secções foram lavadas em tampão e contrastadas da mesma forma que realizada para a análise ultraestrutural. A partir das imagens, foram avaliadas a densidade de imunomarcção de GDC/ área planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) e a densidade de imunomarcção de GDC/ área celular ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) para células M e BFV. Todas as quantificações, de anatomia e ultraestruturais, foram realizadas utilizando o *software* Image-J.

### 3.5 Trocas Gasosas

A determinação das trocas gasosas foi realizada para as espécies *H. glutinosa*, *H. isocalycia* e *H. aturensis*. As medidas de curvas  $A/C_i$  foram realizadas utilizando o LiCor LI-6400-XT, com temperatura foliar de 30°C, densidade de fluxo de fótons de 1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  e déficit de pressão de vapor entre folha e ar de aproximadamente 2 kPa. Para evitar trocas entre o ar externo e interno, utilizou-se uma graxa à base de silicone na borda da câmara. O ponto inicial de cada curva foi 400  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , sendo essa concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  aumentada para os valores de 1500, 1000 e 750  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  e, em seguida, reduzida de 200 à 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  para *H. glutinosa* e *H. isocalycia* e de 200 a 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$  para *H. aturensis*.

O ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  foi determinado a partir do intercepto no eixo x das regressões lineares dos menores pontos de concentração intercelular de  $\text{CO}_2$ . Para *H. glutinosa* e *H. isocalycia* esse pontos foram 100, 90, 80, 70, 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ , enquanto para *H. aturensis* foram 100, 90, 80, 70, 60, 50,

40, 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Para essa avaliação, foram utilizadas três plantas, realizando-se um total de 10 curvas  $A/C_i$  por espécie. Além disso, para as três espécies foram determinadas a assimilação líquida  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) e eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) na concentração de 400  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ , razão concentração interna/ concentração ambiental de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ) e eficiência de carboxilação ( $EC$ ).

### 3.6 Análise de dados

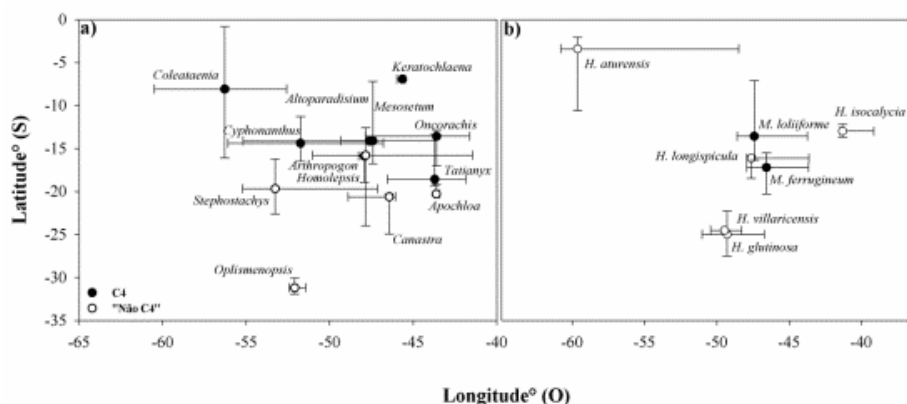
Os dados de anatomia foliar, ultraestrutura, imunomarcção enzimática da GDC e curvas  $A/C_i$  foram testados quanto à normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a normalização, alguns dados foram transformados em  $\log(x+1)$ . Realizou-se o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey ( $P<0,05$ ), utilizando o Sigma Plot 11.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Distribuição ambiental

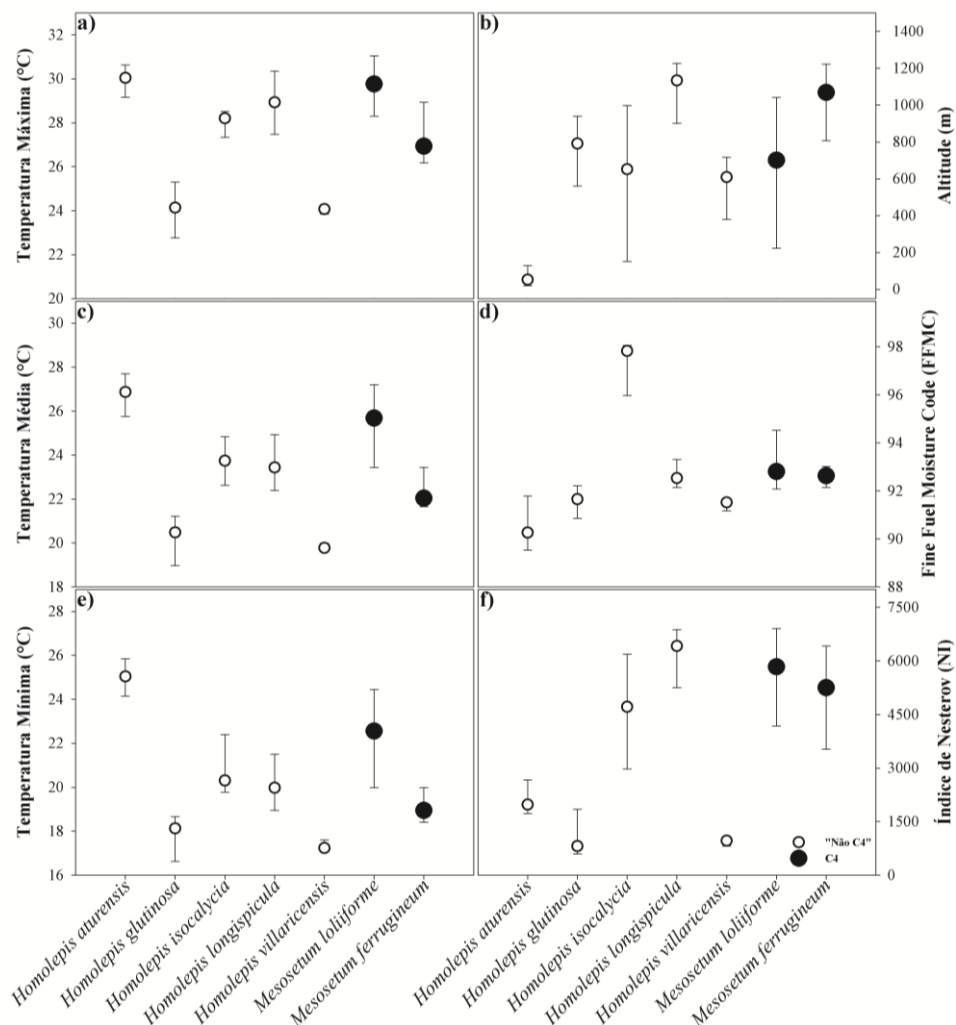
A subtribo Arthropogoninae é composta por 16 gêneros e cerca de 80 espécies. Destes, 13 apresentam registros de coleta no Brasil (www.tropicos.org; www.splink.org.br). Em relação à distribuição longitudinal desses gêneros, não houve diferenciação entre os “não C4” e os C4. Entretanto, os gêneros C4 estão predominantemente localizados em latitudes mais baixas, quando comparados aos demais (FIGURA 3-A). Analisando apenas as espécies do gênero *Homolepis* e duas do *Mesosetum*, pode-se perceber que *H. aturensis* é a espécie que ocupa localidades com latitudes mais baixas, nas regiões Norte e Nordeste do Brasil enquanto *H. glutinosa* e *H. villaricensis* possuem ocorrência associada às regiões Sul e Sudeste de latitudes mais baixas (FIGURA 3-B).

Figura 3 - Distribuição dos gêneros da subtribo Arthropogoninae (a) e de espécies do clado *Homolepis/Mesosetum* (b) em relação à Latitude° (S) e Longitude° (O). Círculos pretos, gêneros/ espécies C4; Círculos brancos, gêneros/ espécies “Não C4”. Os símbolos representam a mediana e as barras 25°- 75° percentil.



Em relação aos fatores ambientais considerados nas análises, o gênero *Oplismenopsis* ocorre nas localidades com menor mediana de elevação (14 m) e o *Altoparadisium* em locais mais elevados (1056 m) (FIGURAS 3-B e 4-A, ANEXO). *H. aturensis* encontra-se em altitudes com mediana de 53 m e *H. longispicula* em 1134 m (FIGURAS 4-B e 5-A). Os gêneros C4 *Coleataenia*, *Cyphonanthus*, *Keratochlaena* e *Mesosetum* apresentaram distribuições relacionadas com regiões de elevadas temperaturas média, máxima e mínima (FIGURAS 3-A, C e E e 4-B, C e D, ANEXO). A *H. aturensis* apresentou distribuição em locais de maiores temperaturas média, máxima e mínima enquanto as menores foram para *H. glutinosa* e *H. villaricensis* (FIGURAS 4-A, C e E e 5- B, C e D).

Figura 4 - Faixas de ocorrência de espécies do clado *Homolepis/Mesosetum* em relação à Temperatura Máxima (°C) (a), Altitude (m) (b), Temperatura Média (°C) (c), *Fine Fuel Moisture Code* (FFMC) (d), Temperatura Mínima (°C) (e) e Índice de Nesterov (NI) (f). Círculos brancos, espécies “Não C4”; Círculos pretos, espécies C4. Os símbolos representam a mediana e as barras 25°- 75° percentil.

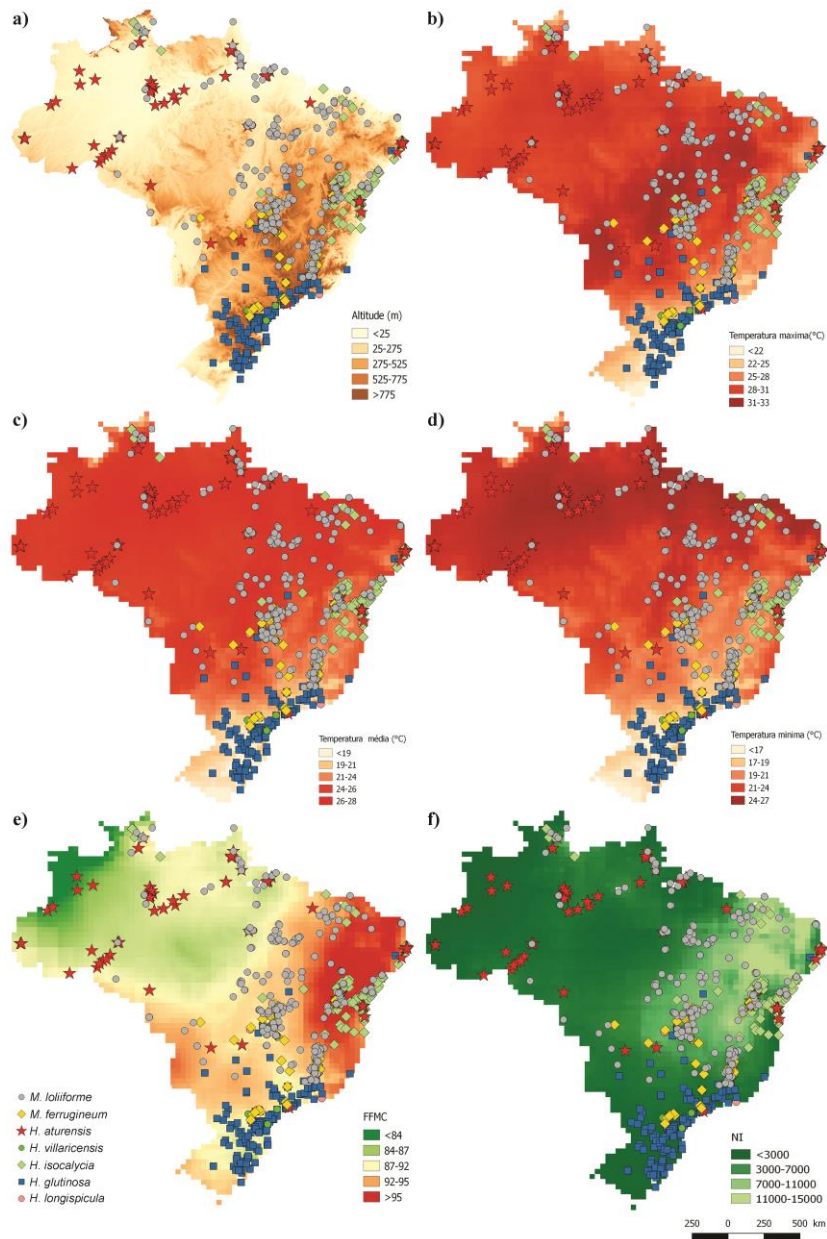


Para o risco de ocorrência de incêndio todos os gêneros apresentaram distribuição em localidades com altos valores de *FFMC*, sendo o menor valor



(91,6) para o gênero *Canastra* e o maior (94,8) para *Oncorachis* (FIGURAS 3-D e 4-E, ANEXO). Entre as *Homolepis*, a *H. isocalycia* apresentou a maior mediana de *FFMC* (97,8) (FIGURAS 4-D e 5-E). Os gêneros “não C4” apresentaram distribuição em locais de baixo *NI*, sendo a menor mediana (673,28) do gênero *Oplismenopsis*. Já a maior mediana (7375,37) foi registrada em *Keratochlaena* (FIGURAS 3-E e 4-F, ANEXO). As espécies *H. glutinosa* e *H. villaricensis* tiveram ocorrência associada a locais com baixo *NI*, com medianas de 814,24 e 968,26, respectivamente. Em relação às maiores medianas de *NI*, estas foram associadas com as espécies *H. isocalycia*, *H. longispicula*, *M. loliiforme* e *M. ferrugineum* (FIGURAS 4-E e 5-F).

Figura 5 - Distribuição geográfica de espécies do clado *Homolepis/Mesosetum* em relação à Temperatura Máxima (°C) (a), Altitude (m) (b), Temperatura Média (°C) (c), *Fine Fuel Moisture Code* (FFMC) (d), Temperatura Mínima (°C) (e) e Índice de Nesterov (NI) (f).



#### 4.2 Composição isotópica de carbono em matéria seca

Do total de gêneros que compõem a subtribo Arthropogoninae, 11 estão representados quanto aos valores de isótopos de carbono, abrangendo um total de 52 espécies, o que representa 65% do número total relativo a subtribo. Os valores de isótopos de carbono variaram entre as espécies estudadas, o que reflete a diversidade fotossintética encontrada na subtribo. Do total de espécies analisadas, 40,4% delas possuem  $\delta^{13}\text{C}$  relacionado ao “tipo C3”<sup>16</sup>, variando entre -23,1 e -32,5‰. Já os 59,6% restantes representam  $\delta^{13}\text{C}$  “tipo C4”<sup>17</sup>, com valores de -10,2 à -14,1‰ (TABELA 1).

---

<sup>16</sup> Trata-se de espécies que possuem características similares a espécies que utilizam a via fotossintética C3, são classificadas filogeneticamente como C3, entretanto podem representar um estágio intermediário.

<sup>17</sup> Trata-se de espécies que possuem características similares a espécies que utilizam a via fotossintética C4, são classificadas filogeneticamente como C4, entretanto podem representar um estágio intermediário.

Tabela 1 - Composição isotópica de carbono em matéria seca de 11 gêneros pertencentes à subtribo Arthropogoninae.

(Continua)

| Metabolismo fotossintético | Espécies                         | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| "Tipo C3"                  | <i>Phanopyrum gymnocarpum</i>    | -32,5                     |
|                            | <i>Homolepis villaricensis</i>   | -32,0                     |
|                            | <i>Homolepis aturensis</i>       | -30,7                     |
|                            | <i>Homolepis glutinosa</i>       | -29,6                     |
|                            | <i>Homolepis isocalycia</i>      | -28,1                     |
|                            | <i>Homolepis longispicula</i>    | -27,5                     |
|                            | <i>Canastra lanceolata</i>       | -27,5                     |
|                            | <i>Oplismenopsis najada</i>      | -27,1                     |
|                            | <i>Apochloa sipapoensis</i>      | -26,1                     |
|                            | <i>Apochloa molinioides</i>      | -25,8                     |
|                            | <i>Apochloa euprepes</i>         | -25,6                     |
|                            | <i>Apochloa animara</i>          | -25,4                     |
|                            | <i>Apochloa lorea</i>            | -25,4                     |
|                            | <i>Apochloa poliophylla</i>      | -25,1                     |
|                            | <i>Apochloa steyermarkii</i>     | -25,0                     |
|                            | <i>Apochloa chnoodes</i>         | -24,6                     |
|                            | <i>Apochloa cipoensis</i>        | -24,6                     |
|                            | <i>Apochloa bahiensis</i>        | -24,4                     |
|                            | <i>Apochloa lutzii</i>           | -24,3                     |
|                            | <i>Apochloa eligulata</i>        | -23,1                     |
| "Tipo C4"                  | <i>Colaetaenia anceps</i>        | -14,1                     |
|                            | <i>Mesosetum comatum</i>         | -13,4                     |
|                            | <i>Colaetaenia longifolia</i>    | -13,2                     |
|                            | <i>Mesosetum loliiforme</i>      | -13,1                     |
|                            | <i>Mesosetum rottboellioides</i> | -13,0                     |
|                            | <i>Arthropogon villosus</i>      | -12,6                     |
|                            | <i>Arthropogon fillifolius</i>   | -12,5                     |
|                            | <i>Mesosetum chlorostachyum</i>  | -12,3                     |
|                            | <i>Mesosetum gibbosum</i>        | -12,3                     |
|                            | <i>Oncorachis macranta</i>       | -12,3                     |
|                            | <i>Tatianyx arnacites</i>        | -12,3                     |
|                            | <i>Oncorachis ramosa</i>         | -12,2                     |
|                            | <i>Mesosetum cayennense</i>      | -12,2                     |
| <i>Mesosetum chaseae</i>   | -12,2                            |                           |

Tabela 1 - Composição isotópica de carbono em matéria seca de 11 gêneros pertencentes à subtribo Arthropogoninae.

|                               |                                | (Conclusão)               |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Metabolismo<br>fotossintético | Espécies                       | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) |
|                               | <i>Colaetaenia tenera</i>      | -12,1                     |
|                               | <i>Mesosetum blakei</i>        | -12,1                     |
|                               | <i>Mesosetum alatum</i>        | -12,0                     |
|                               | <i>Mesosetum filifolium</i>    | -12,0                     |
|                               | <i>Mesosetum elytrochaetum</i> | -11,7                     |
|                               | <i>Mesosetum ferrugineum</i>   | -11,6                     |
|                               | <i>Mesosetum arenarium</i>     | -11,5                     |
|                               | <i>Colaetaenia stenodes</i>    | -11,4                     |
|                               | <i>Colaetaenia caricoides</i>  | -11,3                     |
|                               | <i>Colaetaenia petersonii</i>  | -11,3                     |
|                               | <i>Arthropogon xerachne</i>    | -11,3                     |
|                               | <i>Mesosetum exaratum</i>      | -11,0                     |
|                               | <i>Mesosetum pappophorum</i>   | -11,0                     |
|                               | <i>Mesosetum annuum</i>        | -10,8                     |
|                               | <i>Mesosetum pitieri</i>       | -10,3                     |
|                               | <i>Mesosetum wrightii</i>      | -10,2                     |
|                               | <i>Achlaena piptostachya</i>   | -10,2                     |

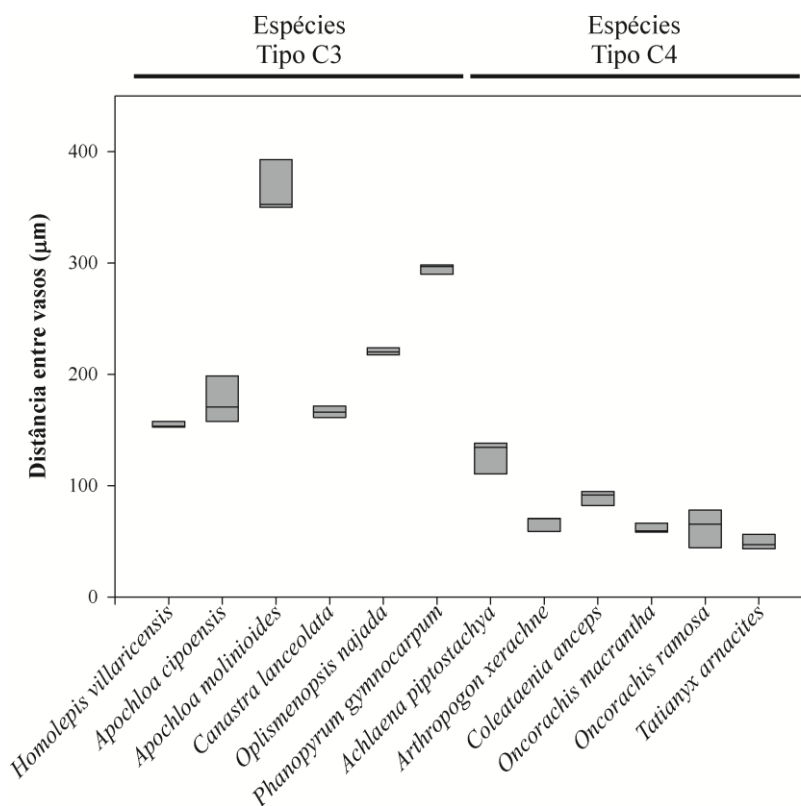
Para as espécies do clado *Homolepis/Mesosetum*, observou-se variação nos resultados de isótopos de carbono, sendo o menor valor de -10,2‰ encontrado para a espécie C4 *M. wrightii*, e o maior valor de -32,0‰ para *H. villaricensis* (TABELA 1).

### 4.3 Anatomia foliar

Com base nos valores de composição isotópica de carbono, foram analisadas a anatomia de 12 espécies provenientes do material herborizado, sendo seis delas com valores relacionados ao “tipo C3” e outras seis com valores “tipo C4”. Todas as espécies relacionadas ao “tipo C3” apresentaram células BFV de origem parenquimática. O maior valor de distância entre feixes

vasculares em espécies “não C4” foi 367,7  $\mu\text{m}$  para *A. molinioides* e 154,8  $\mu\text{m}$  para *H. villaricensis* (FIGURA 6).

Figura 6 - Distância entre dois feixes vasculares ( $\mu\text{m}$ ) em espécies relacionadas ao “tipo C3” e ao “tipo C4” da subtribo Arthropogoninae. Dados representados pelas médias.

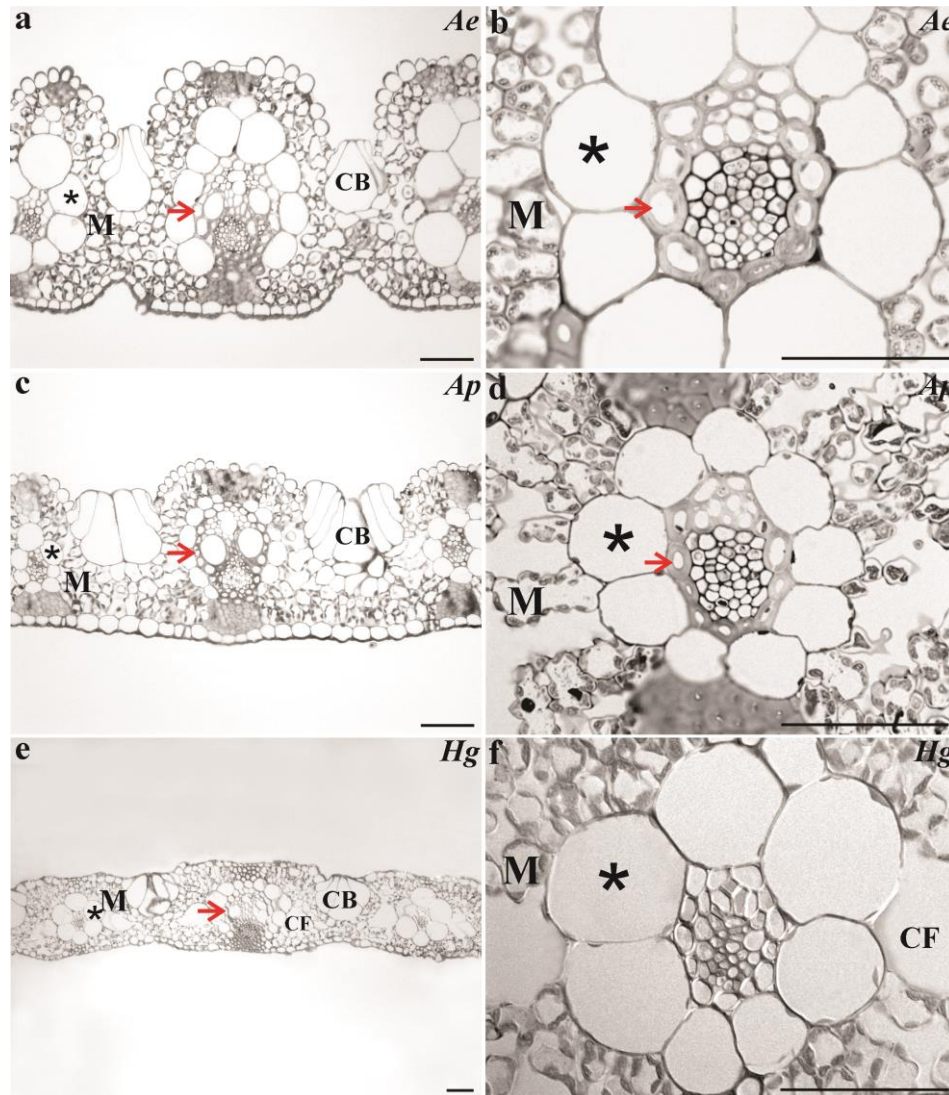


Para todas as espécies, pode-se notar células BFV aumentadas, sendo que *H. villaricensis*, *A. molinioides*, *O. najada* e *P. gymnocarpum* apresentaram organelas organizadas em posição centrípeta (FIGURAS 5 e 6, ANEXO A). Em relação às camadas de células M entre a epiderme e a célula BFV, *A. cipoensis*, *A. molinioides* e *C. lanceolata* são as que parecem possuir maior quantidade (FIGURAS 5 e 6, ANEXO A). Para as espécies com  $\delta^{13}\text{C}$  relacionadas ao “tipo

C4”, o maior valor de distância entre feixes vasculares (126,5  $\mu\text{m}$ ) foi observado em *A. piptostachya* e o menor (49,4  $\mu\text{m}$ ) em *T. arnacites* (FIGURA 6). Essas espécies possuem organelas maiores e em maior quantidade nas células BFV, quando comparadas às “não C4” (FIGURAS 7 e 8, ANEXO). Nas imagens de *A. piptostachya* observaram-se células distintivas entre os feixes vasculares (FIGURA 7, ANEXO A).

Todas as espécies analisadas, fixadas a partir de material vivo, possuem cloroplastos posicionados periféricamente nas células M. As espécies C3 *A. euprepes*, *A. poliophylla* e *H. glutinosa* possuem células BFV aumentadas e relativamente desuniformes, com uma baixa quantidade de cloroplastos organizados em posição centrífuga. Pode-se observar mais de uma camada de células M estendendo-se da célula da bainha até a epiderme (FIGURA 7). Em *H. glutinosa*, assim como em *H. villaricensis* (herborizado), existem células fusóides, adjacentes a todas as células BFV (FIGURA 5, ANEXO A).

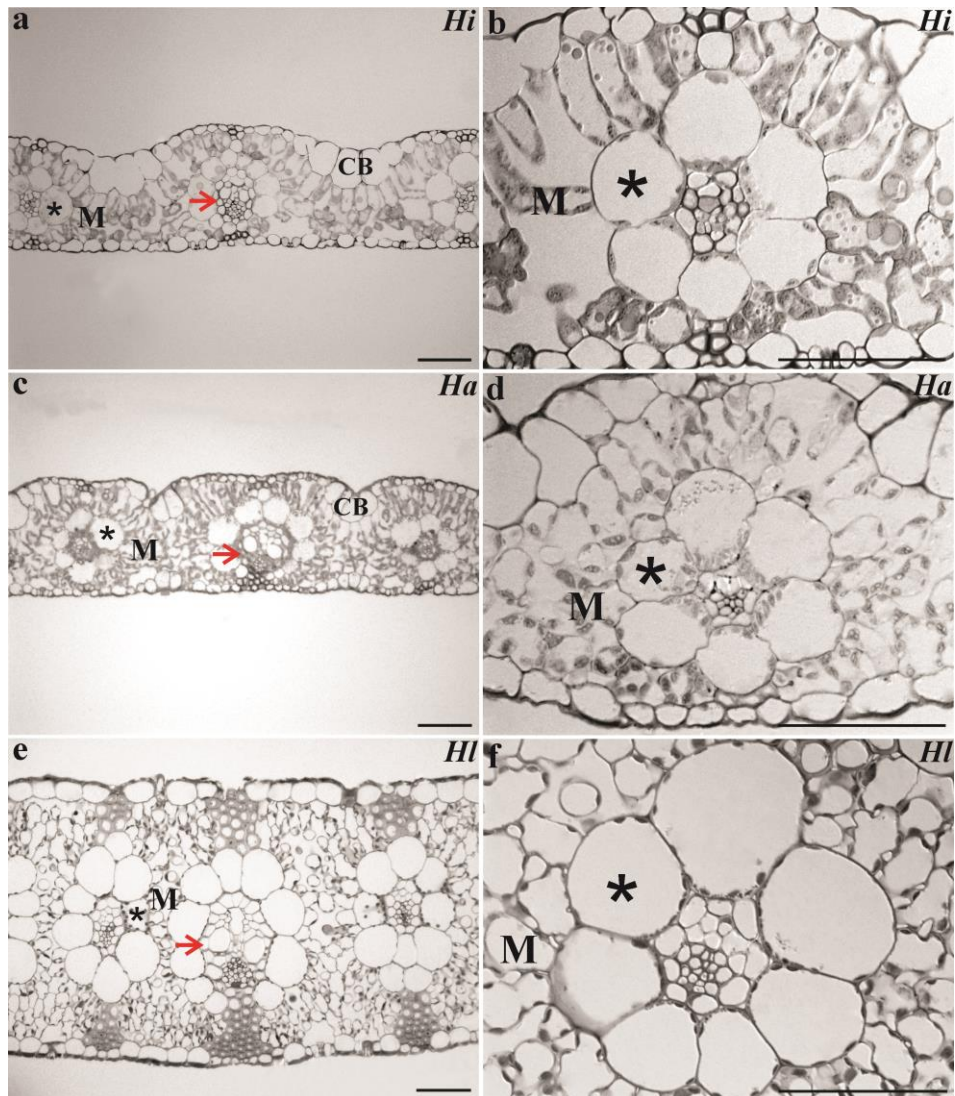
Figura 7 - Secções foliares transversais de plantas cultivadas das espécies C3 *Apochloa euprepes* (Ae- a, b), *Apochloa poliophylla* (Ap- c, d) e *Homolepis glutinosa* (Hg- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática; CF, células fusóides; CB, células buliformes. Barras= 50  $\mu$ m.





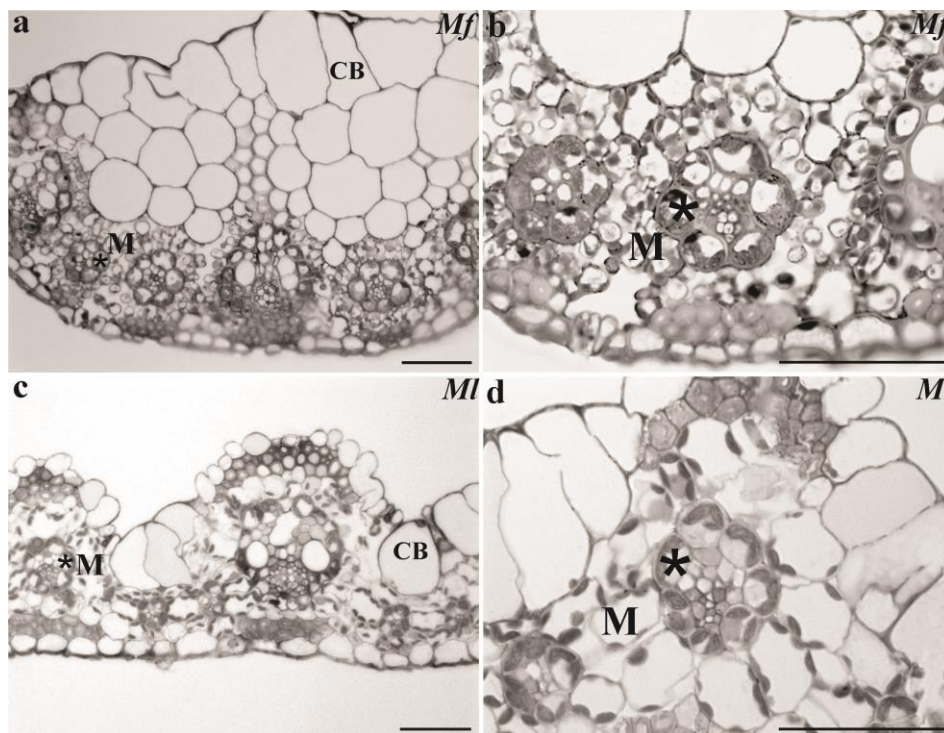
As espécies intermediárias, *H. isocalycia*, *H. aturensis* e *H. longispicula*, também possuem células BFV maiores, entretanto estas apresentam um padrão de tamanho mais uniforme e com maior número de cloroplastos, quando comparadas às da C3 (FIGURA 8). Para *H. isocalycia*, os cloroplastos estão posicionados centrifugamente, enquanto na *H. aturensis* e *H. longispicula* a posição é centrípeta, associados, perpendicularmente, à parede interna da célula BFV (FIGURAS 8-B, D e F; FIGURA 9, ANEXO). Todas essas espécies, os feixes menores possuem uma camada de células M, ocupando o espaço entre a BFV e a epiderme.

Figura 8 - Secções foliares transversais de plantas cultivadas das espécies intermediárias *Homolepis isocalyca* (Hi- a, b), *Homolepis aturensis* (Ha- c, d) e *Homolepis longispicula* (Hl- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática; CF, células fusóides; CB, células buliformes. Barras= 50 µm.



Para as C4 *M. ferrugineum* e *M. loliiforme*, apesar das células BFV serem menores, estas possuem paredes mais espessas e não se encontram totalmente expostas a espaços intercelulares (FIGURA 9). Os cloroplastos são maiores do que os observados nas espécies descritas anteriormente, sendo posicionados centrifugamente e predominantemente associados à parede externa da célula BFV (FIGURA 9- B e D). Da mesma forma que nas intermediárias, nos feixes menores, apenas uma camada de células M conecta a célula BFV à epiderme. As espécies C3 e intermediárias, independente do tipo de material utilizado para a análise, possuem duas camadas de células ao redor do feixe vascular, sendo a camada interna às células BFV denominada bainha mestomática. Já nas espécies C4, a bainha mestomática é ausente, havendo apenas uma camada de células ao redor dos feixes vasculares.

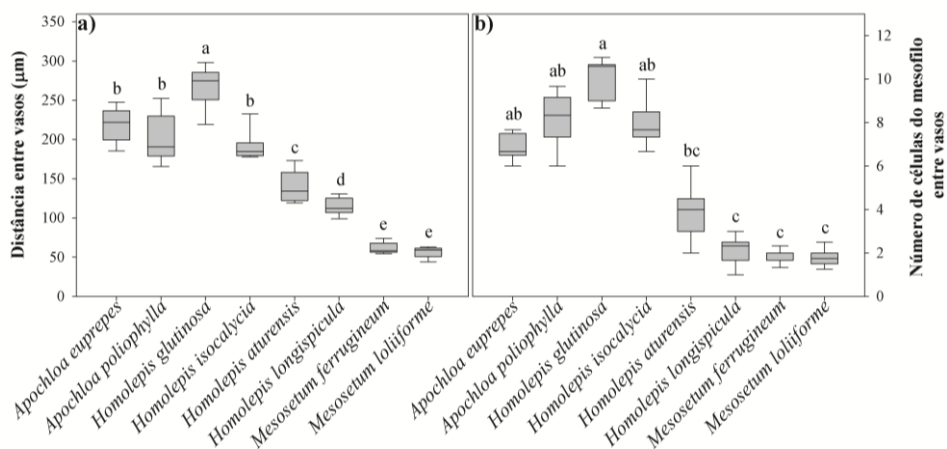
Figura 9 - Secções foliares transversais de plantas cultivadas das espécies C4 *Mesosetum ferrugineum* (Mf- a, b) e *Mesosetum loliiforme* (Ml- c, d) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática; CF, células fusóides; CB, células buliformes. Barras= 50 µm.



O estudo quantitativo das seções anatômicas mostrou um padrão de diminuição na distância entre feixes vasculares e no número de células M entre eles. As espécies *A. euprepes* e *A. poliophylla* apresentaram distâncias de 217,5 µm e 200,8 µm e em média 7 e 8 células M entre os feixes vasculares, respectivamente (FIGURA 10-A e B). Apesar desses valores serem maiores quando comparados às C4, eles são menores em relação à C3 *H. glutinosa*. Dessa forma, essas variáveis nas duas espécies do gênero *Apochloa* se assemelham mais ao padrão de intermediárias do gênero *Homolepis*. A *H.*

*glutinosa* possui os maiores valores de distância (268,2  $\mu\text{m}$ ) e de número de células (10) entre os feixes (FIGURA 10-A e B). Em relação às outras espécies do gênero, pode-se notar uma diminuição progressiva nesses números com os menores valores observados para *H. longispicula* (114,7  $\mu\text{m}$  e 2 células). Na comparação entre todas as espécies, o menor valor (56,4  $\mu\text{m}$ ) de distância entre os feixes vasculares foi observado para *M. loliiforme*, enquanto o seu número de células entre eles foi comparável à *H. longispicula* e *M. ferrugineum* (FIGURA 10-A e B).

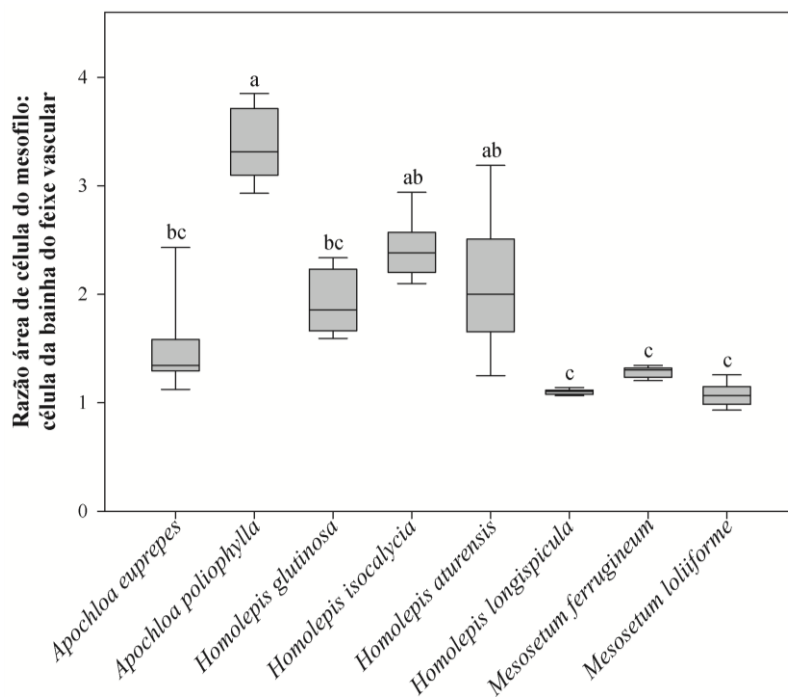
Figura 10 - Distância entre dois feixes vasculares ( $\mu\text{m}$ ) (a) e número de células do mesofilo entre dois feixes vasculares (b) para as espécies *Apochloa euprepes*, *A. poliophylla*, *Homolepis glutinosa*, *H. isocalycia*, *H. aturensis*, *H. longispicula*, *Mesosetum ferrugineum* e *M. loliiforme*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Em relação à razão M:BFV, o maior valor de 3,37 foi observado para *A. poliophylla*, enquanto o menor valor de 1,10 para *H. longispicula* (FIGURA 11). É provável que o aumento desse valor para *A. poliophylla* esteja relacionado com sua baixa porcentagem de células BFV (11%) (TABELA 3, ANEXO). Já

para *H. longispicula*, os valores de células BFV e M foram similares (31 e 34%), estando isso relacionado com a baixa razão. O mesmo padrão foi observado para as C4. Para *A. euprepes*, a porcentagem de células BFV foi de 24%, sendo a razão M:BFV de 1,50, comparável às C4 *M. ferrugineum* e *M. loliiforme* (FIGURA 11; TABELA 3, ANEXO).

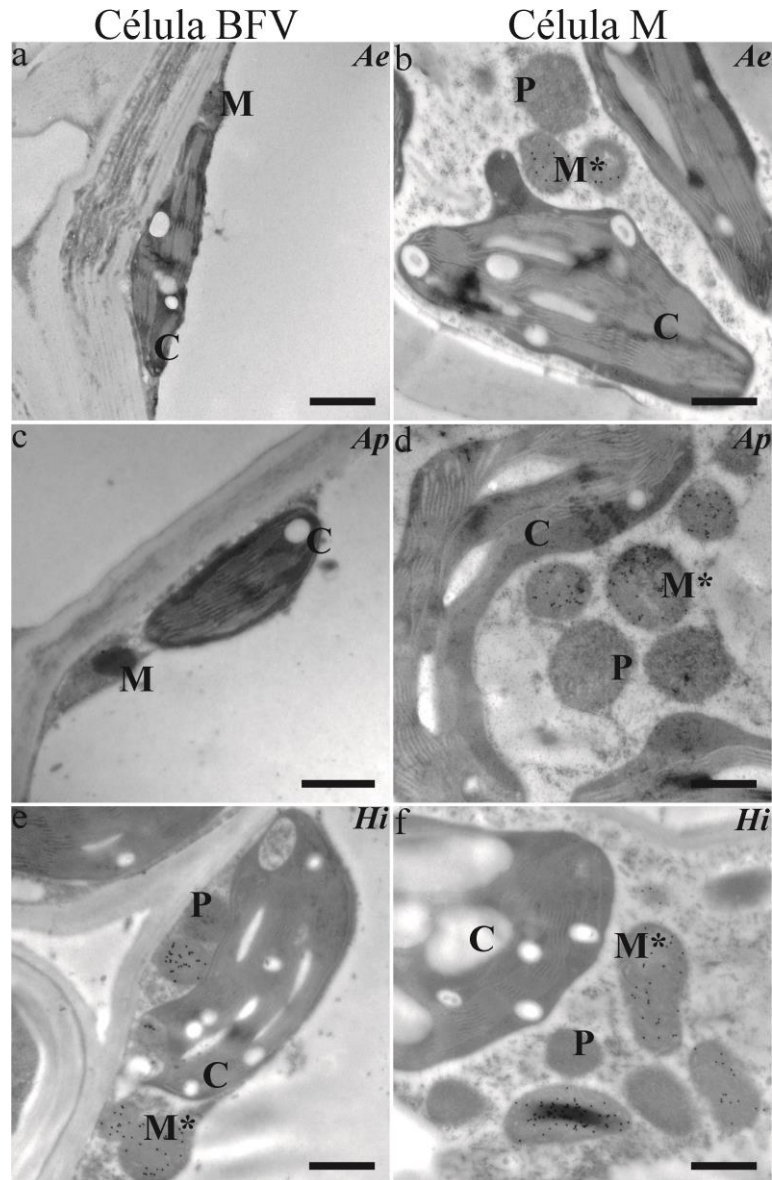
Figura 11 - Razão área de célula do mesofilo: área de célula da bainha do feixe vascular para as espécies *Apochloa euprepes*, *A. poliophylla*, *Homolepis glutinosa*, *H. isocalyca*, *H. aturensis*, *H. longispicula*, *Mesosetum ferrugineum* e *M. loliiforme*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



#### 4.4 Ultraestrutura e imunomarcação enzimática

A maior média de área da célula M foi da *H. aturensis* ( $318.18 \mu\text{m}^2$ ) e a menor ( $62,24 \mu\text{m}^2$ ) para *M. ferrugineum* (TABELA 4, ANEXO). A parede celular M foi mais espessa ( $0,44 \mu\text{m}$ ) para *A. euprepes*, enquanto *H. aturensis* apresentou menor espessura ( $0,14 \mu\text{m}$ ) (TABELA 4, ANEXO). As células M das espécies C3 *A. euprepes* e *A. poliophylla* e da intermediária *H. isocalycia* (FIGURA 12) possuem uma maior porcentagem de área de cloroplastos por área celular (23,3; 26,4 e 22,1%, respectivamente), em relação à *H. aturensis* (17,7%) e *M. ferrugineum* (14,2%) (FIGURA 13-C; 14), sendo o mesmo padrão observado para o número de cloroplastos em relação à área celular (TABELA 5, ANEXO).

Figura 12 - Ultraestrutura e imunomarcção de GDC em células da bainha do feixe vascular- BFV (a, c, e) e células do mesofilo- M (b, d, f) para as espécies *Apochloa euprepes* (Ae- a, b), *Apochloa poliophylla* (Ap- c, d) e *Homolepis isocalycia* (Hi- e, f). C, cloroplasto; M, mitocôndria; M\*, mitocôndria imunomarcada com GDC; P, peroxissomo. Barras=500nm.





Esse maior investimento em organelas foi encontrado para as mesmas espécies em relação à porcentagem de área mitocondrial por área celular (1,16; 1,38 e 1,26%) e densidade de imunomarcagem de GDC por área mitocondrial (95,1; 114,0 e 57,5  $\mu\text{m}^2$ ) (FIGURAS 12, 13- A e B e 14), bem como para número de mitocôndrias por área celular e densidade de imunomarcagem por área celular (TABELA 5, ANEXO). A espécie *H. glutinosa* apresenta mitocôndrias com GDC nas células M (FIGURA 10, ANEXO). Já em relação à área de peroxissomos por área celular, o menor valor (0,012%) foi observado para *M. ferrugineum* (FIGURA 13-D).

Figura 13 - Área planar de mitocôndrias/área celular (%) (a), densidade de imunomarcagem de GDC/área planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^2$ ) (b), área planar de cloroplastos/área celular (%) (c) e área planar de peroxissomos/área celular (%) (d) em células do mesofilo-M para as espécies *Apochloa euprepes*, *A. poliophylla*, *H. isocalycia*, *H. aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

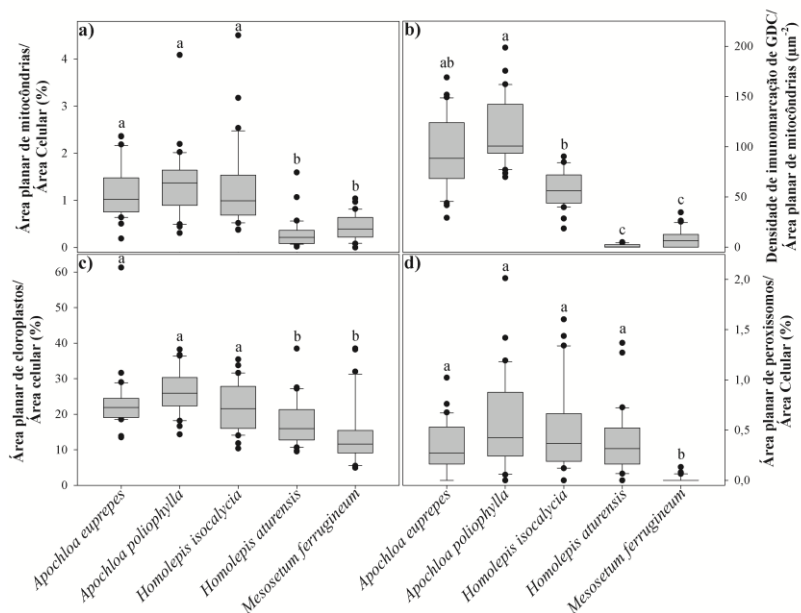
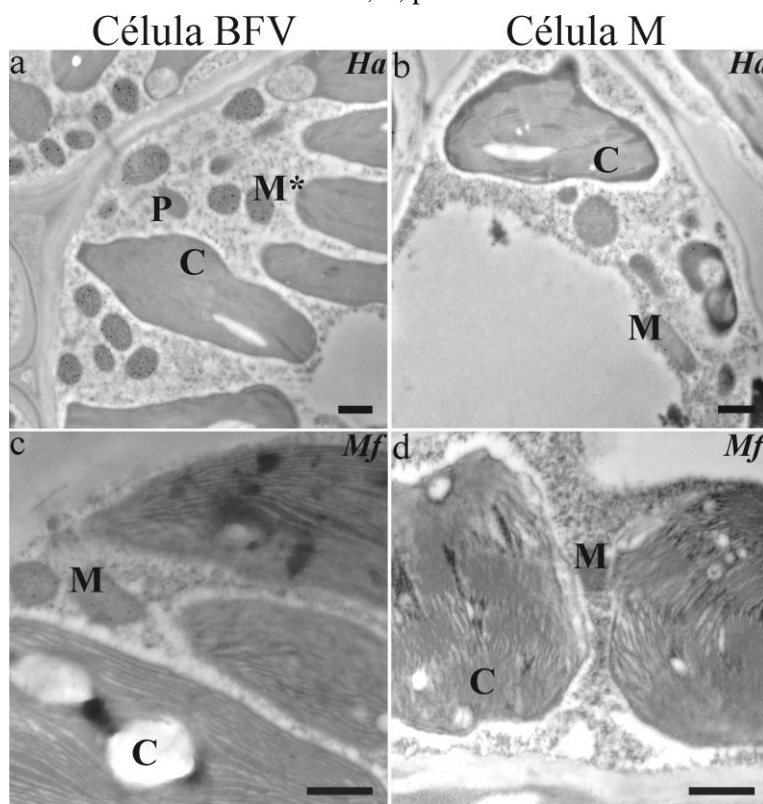
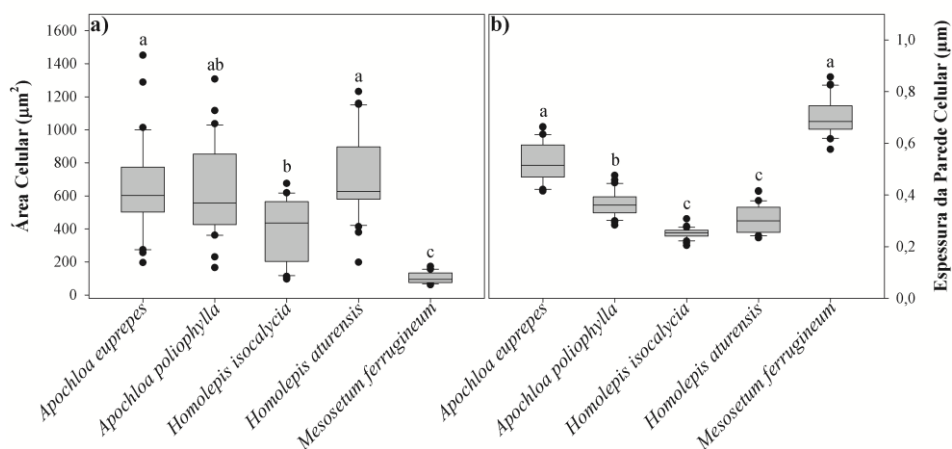


Figura 14 - Ultraestrutura e imunomarcação de GDC em células da bainha do feixe vascular- BFV (a, c) e células do mesófilo- M (b, d) para as espécies *Homolepis aturensis* (Ha- a, b) e *Mesosetum ferrugineum* (Mf- c, d). C, cloroplasto; M, mitocôndria; M\*, mitocôndria imunomarcada com GDC; P, peroxissomo. Barras=500nm.



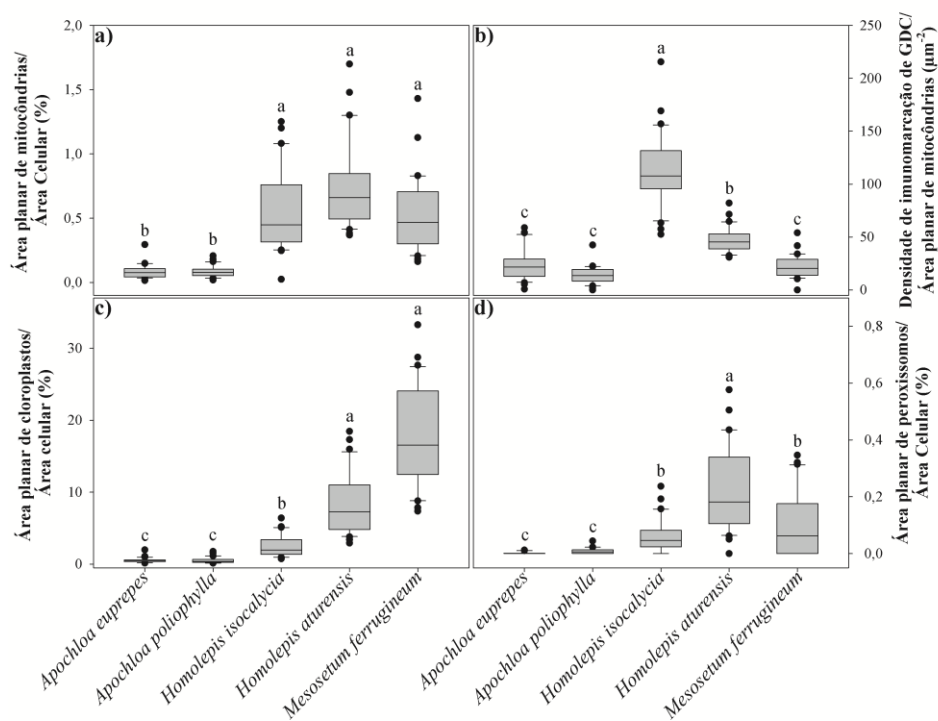
Para as células BFV, a maior área ( $733,71 \mu\text{m}^2$ ) pertence à *H. aturensis* enquanto a menor ( $103,97 \mu\text{m}^2$ ) à *M. ferrugineum* (FIGURA 15-A). Em relação à espessura da parede celular, *M. ferrugineum* apresentou o maior valor ( $0,70 \mu\text{m}$ ), além de ser observada a suberização na lamela média (FIGURAS 15-B; 12-c, ANEXO). A menor espessura ( $0,25 \mu\text{m}$ ) foi registrada para *H. isocalycia* (FIGURA 15-B). Para as C3 e as intermediárias, a suberização da lamela média está relacionada com a bainha mestomática.

Figura 15 - Área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) (a) e espessura da parede celular ( $\mu\text{m}$ ) (b) em células da bainha do feixe vascular-BFV para as espécies *Apochloa euprepes*, *A. poliophylla*, *H. isocalyctia*, *H. aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Houve um aumento da área celular coberta por cloroplastos, na medida em que as espécies apresentaram caracteres mais similares aos da via C4, sendo o mesmo padrão para a razão entre o número de cloroplastos e a área celular (FIGURAS 12, 14 e 16-C). As espécies C3 *A. euprepes* e *A. poliophylla* apresentaram 0,6 e 0,5%, respectivamente, dessas organelas na área celular BFV (FIGURA 16-C). Incremento significativo foi observado para as intermediárias *H. isocalyctia* e *H. aturensis*, sendo mais da metade dos cloroplastos situados na porção interna das células BFV (FIGURA 16-C; TABELA 7, ANEXO). Já para a C4 *M. ferrugineum*, o maior valor de 17,6% foi registrado, sendo apenas 12% destes situados na porção interna da célula BFV (FIGURA 16-C; TABELA 7, ANEXO).

Figura 16 - Área planar de mitocôndrias/área celular (%) (a), densidade de imunomarcção de GDC/área planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^2$ ) (b), área planar de cloroplastos/área celular (%) (c) e área planar de peroxissomos/área celular (%) (d) em células Da bainha do feixe vascular-BFV para as espécies *Apochloa euprepes*, *A. poliophylla*, *H. isocalyca*, *H. aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).



Padrão similar de incremento foi observado para mitocôndrias e peroxissomos, com a diferença de que os maiores valores destas foram para *H. aturensis*. A porcentagem de área mitocondrial e de peroxissomos por área celular para essa intermediária foi de 0,73 e 0,23%, respectivamente (FIGURA 16-A e D). Já os menores valores para ambas as organelas foram observados nas

espécies C3. A maior densidade de imunomarcção de GDC por área mitocondrial foi encontrada em *H. isocalycia*, com valor de  $112,3 \mu\text{m}^2$ , enquanto os menores valores para essa variável foram referentes às C2 e C4 (FIGURAS 12, 14 e 16-B). Da mesma forma que as outras C3, *H. glutinosa* apresentou baixa densidade de GDC nesse tipo celular (FIGURA 10, ANEXO). Para a espécie *H. isocalycia*, nas células BFV pode-se observar cloroplastos predominantemente alongados, paralelos à parede celular e sempre associados com mitocôndrias e peroxissomos (FIGURA 12-E). Já em *H. aturensis*, os cloroplastos também possuem formato alongado, entretanto estes são associados à parede interna das células BFV, com orientação perpendicular e formando uma barreira externa às mitocôndrias e peroxissomos, também associados a essa área da célula (FIGURA 16-C) Nas espécies C3 e intermediárias, pode-se observar, através de imunomarcção, que a Rubisco está localizada nos cloroplastos de ambos os tipos celulares (FIGURA 11, ANEXO). Já para a C4, como esperado, a Rubisco é exclusiva da célula BFV e a PEPc da célula M (FIGURA 12, ANEXO).

#### 4.5 Trocas gasosas

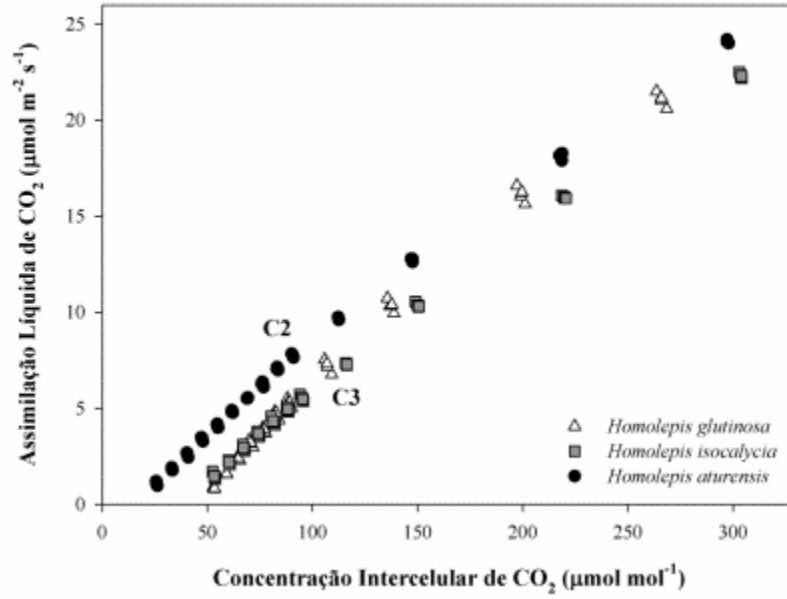
Os valores de  $A$  em  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  não apresentaram diferenças estatísticas entre as espécies avaliadas (TABELA 2). Já para  $A/g_s$ , o maior valor de  $60,0 \mu\text{mol mol}^{-1}$  foi registrado para *H. glutinosa* e os menores valores para *H. isocalycia* e *H. aturensis*, não havendo diferenças entre estas.

Tabela 2 - Assimilação líquida  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), razão concentração interna/concentração ambiental de  $\text{CO}_2$  ( $C_i/C_a$ ), eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ), ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  ( $\Gamma$ ), eficiência de carboxilação ( $EC$ ) para as espécies *Homolepis glutinosa*, *Homolepis isocalycia* e *Homolepis aturensis*. Os valores de  $A$  e  $A/g_s$  são referentes a  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$  (valor médio da concentração de  $\text{CO}_2$  na atmosfera atual). Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Espécies                    | $A$<br>( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) | $C_i/C_a$                     | $A/g_s$<br>( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) | $\Gamma$<br>( $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) | $EC$<br>( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) |
|-----------------------------|--|-------------------------------|---|--|--|
| <i>Homolepis glutinosa</i>  | 21,10 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>                    | 0,70 $\pm$ 0,009 <sup>b</sup> | 60,0 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>             | 46,1 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>              | 0,12 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>                  |
| <i>Homolepis isocalycia</i> | 22,20 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>                    | 0,80 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup> | 39,3 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>             | 38,7 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup>             | 0,10 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>                 |
| <i>Homolepis aturensis</i>  | 23,20 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>                    | 0,77 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup> | 44,0 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>             | 15,7 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>              | 0,09 $\pm$ 0,007 <sup>b</sup>                  |

Em relação às curvas  $A/C_i$ , padrões similares foram encontrados para *H. glutinosa* e *H. isocalycia*, sendo  $\Gamma$  o da primeira espécie de  $46,1 \mu\text{mol mol}^{-1}$ . Em relação à *H. aturensis*, pode-se notar uma diminuição no  $\Gamma$  dessa espécie, com valor de  $15,7 \mu\text{mol mol}^{-1}$  (FIGURA 17). O mesmo foi observado para  $EC$ , com maior valor de  $0,12 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para *H. glutinosa* e  $0,09 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para *H. aturensis*.

Figura 17 - Assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) em resposta a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) para as espécies *Homolepis glutinosa* (triângulo branco), *Homolepis isocalyca* (quadrado cinza) e *Homolepis aturensis* (círculo preto).



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 A sobreposição de nichos ecológicos entre gêneros “não C4” e C4 da subtribo *Arthropogoninae* evidencia a pré-disposição para a evolução dessa via fotossintética nesse grupo

Os gêneros da subtribo *Arthropogoninae* possuem um padrão de distribuição latitudinal, de modo que a ocorrência C4 está associada a latitudes mais baixas em relação aos “não C4” (FIGURA 3). Já em relação à altitude, apesar da maior mediana (1056 m) ter sido registrada para o gênero C4 *Altoparadisium* (FIGURA3, ANEXO), esse valor está dentro da faixa para a ocorrência C4, que somente se tornam ausentes acima de 4000 m (BREMONT; BOOM; FAVIER, 2012). Poáceas C4 dominam áreas de pastagens e savanas tropicais (EDWARDS; SMITH, 2010; SAGE; WEDIN; LI, 1999), regiões localizadas em baixas latitudes e altitudes. A diversificação da via C4 é bem associada a ambientes quentes como uma resposta evolutiva ao aumento das taxas fotorrespiratórias (EDWARDS; SMITH, 2010; SAGE, 2004; SAGE; STATA, 2015), de modo que a distribuição latitudinal e altitudinal C3 e C4 tem relação direta com a temperatura (BREMONT; BOOM; FAVIER, 2012; SAGE; WEDIN; LI, 1999).

Dos cinco gêneros classificados como C3, *Apochloa*, *Canastra* e *Oplismenopsis* apresentaram menor relação de distribuição com locais de temperaturas mais elevadas, quando comparado aos demais (FIGURA 3-A, C e E, ANEXO). Destes, *Oplismenopsis* é o que está associado a menores temperaturas, sendo que a mediana para a temperatura máxima não ultrapassa 22°C (FIGURA 3-A, ANEXO). Padrão similar foi observado para as espécies *H. glutinosa* e *H. villaricensis* (FIGURA 4- A, C e E). A temperatura é o principal fator que afeta a distribuição de poáceas C3 e C4 na América do Sul, sendo observada a queda do rendimento C3 com o aumento de temperatura



(BREMONT; BOOM; FAVIER, 2012). Elevadas temperaturas aumentam a atividade oxigenase da Rubisco, além dos efeitos negativos no transporte de elétrons, diminuindo o rendimento fotossintético de espécies C3 (SAGE; WAY; KUBIEN, 2008). Uma vez que, em plantas, a eficiência fotossintética em relação ao ambiente é um fator determinante no nicho ecológico, o surgimento da via C4 está ligado à diminuição das perdas fotorrespiratórias (LUNDGREN et al., 2015).

Os gêneros C4 possuem distribuição associada a locais com maiores temperaturas, sendo essa característica compartilhada pelos gêneros *Strophostachys* (“não C4”) e *Homolepis* (C3 e intermediário) (FIGURAS 4- A, C e E; 3-A, C e E, ANEXO). Apesar do aumento de temperatura estar ligado ao aumento de riqueza de espécies que utilizam a via C4 (MURPHY; BOWMAN, 2007; STILL et al., 2003), o único gênero do clado estudado que possui distribuição ligada às temperaturas abaixo do *crossover* C3-C4 é o *Oplismenopsis*. De acordo com a hipótese de temperatura de *crossover*, poáceas C3 deveriam predominar ambientes em com temperaturas diárias de 22°C, enquanto que as C4 poderiam exceder 30°C (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997). Poáceas PACMAD C3 e C4 compartilham preferências de temperaturas, de modo que a evolução da via C4 esteja associada somente à clados previamente adaptados a altas temperaturas (EDWARDS; STILL, 2008; GRIFFITHS et al., 2013). Nesse sentido, plantas intermediárias entre as duas vias tendem a ocupar áreas mais quentes, por já possuírem tolerância ao aumento de temperatura (LUNDGREN; CHRISTIN, 2016). *H. aturensis*, *H. isocalycia* e *H. longispicula* compartilharam faixas de temperatura similares às C4 *M. ferrugineum* e *M. loliiforme* (FIGURA 4- A, C e E), indicando essa pré-adaptação para o surgimento dessa via.

Além da temperatura, a disponibilidade de água explicaria a distribuição C4 (VISSER et al., 2012), sendo um fator secundário que afeta a abundância de

espécies C3 e C4 (MURPHY; BOWMAN, 2007). Os valores de *NI* indicam que todos os gêneros C4, “não C4” *Apochloa*, e as intermediárias *H. isocalyca* e *H. longispicula* estão classificados em uma escala 4 de severidade à seca (FIGURAS 4-F; 3-F, ANEXO). Esse índice é composto por ponto de orvalho, temperatura e precipitação diários (STOCKS et al., 1996), sendo seus valores utilizados para classificar as áreas numa escala de severidade que varia de 1 à 6 (VOLOKITINA, 1996). Dessa maneira, a partir desses valores pode-se inferir que parte dos gêneros que compõem a subtribo Arthropogoninae são adaptados a condições de limitação hídrica.

As origens de plantas C4 possuem uma alta relação com ambientes secos (EDWARDS; SMITH, 2010), sendo que espécies da subfamília Panicoideae, a qual a subtribo Arthropogoninae pertence, possuem elevada tolerância à seca (LIU; OSBORNE, 2015). Plantas C4 possuem vantagens hidráulicas em relação às C3, como maior eficiência do uso da água (GRIFFITHS et al., 2013; LIU; OSBORNE, 2015; SAGE; STATA, 2015), conseguindo manter taxas fotossintéticas e condutância estomática elevadas, bem como potencial hídrico foliar e condutância hidráulica (OSBORNE; SACK, 2012). Porém, nesse caso, a adaptação a ambientes secos parece estar presente em plantas intermediárias e em C3 relacionadas que são capazes de ocupar áreas áridas (LUNDGREN; CHRISTIN, 2016). Nesse contexto, espécies C3 e intermediárias relacionadas com grupos onde houve evolução C4 têm maior chance de ocorrer em ambientes com maior sazonalidade de chuva, onde existe maior propensão para períodos de seca (OSBORNE; SACK, 2012).

Isso pode explicar a relação da evolução e distribuição de espécies C4 em conjunto com o estabelecimento de savanas, áreas com estações mais bem definidas (EDWARDS; SMITH, 2010). Além das vantagens fisiológicas em locais com disponibilidade hídrica limitada, o estabelecimento de espécies C4 nessas regiões estaria relacionado com a capacidade de impedir o

estabelecimento de vegetação com dossel (EDWARDS; SMITH, 2010). Dessa maneira, a distribuição de poáceas C4 confinadas a ambientes abertos estaria também ligada à maior disponibilidade de radiação nessas regiões (OSBORNE; FRECKLETON, 2009).

O *NI* também é capaz de fornecer uma ideia de risco de incêndio em determinadas regiões, sendo valores entre 1000 e 4000 indicadores de um alto potencial de ignição (STOCKS et al, 1996). Nesse contexto, apenas o gênero *Oplismenopsis* estaria localizado em área com baixo risco de queimada (FIGURA 3-F). Ao utilizar o índice *FFMC*, por meio do qual também se pode inferir sobre queimadas, todos os gêneros estão localizados em áreas com elevado risco, sendo o valor mínimo de 91,6 observado para *Oplismenopsis* (FIGURA 3-D). Valores para esse índice acima de 91 indicam alto potencial de ignição e propagação de fogo (FLANNIGAN et al., 2016). Já para a intermediária *H. aturensis* o *FFMC* foi de 90,2 (FIGURA 4-D). Alguns estudos consideram que valores acima de 83 estão relacionados com locais de risco extremo em relação ao potencial de ignição (GROOT; WARDATI; WANG, 2005). Apesar disso, essa espécie ocorre em áreas com chance de seca e de incêndio reduzidas (FIGURA 5-E), uma vez que a ocorrência dela está associada a localidades de florestas tropicais (LUNDGREN; CHRISTIN, 2016).

O aumento da aridez e eventos de queimadas seriam forças motrizes para a evolução da via C4 (SAGE, 2001), uma vez que o fogo é considerado um dos fatores que permite a manutenção de pastagens (BOND, 2008). Campo rupestre é uma região propensa a queimadas (SILVEIRA et al., 2016), sendo a coleta das espécies *A. euprepes*, *A. poliophylla*, *H. isocalyca* e *H. longispicula* realizada na Serra do Cipó região que faz parte da Cadeia do Espinhaço e possui áreas de campo rupestre. Nesse caso, gêneros de ambos os tipos fotossintéticos, bem como os pontos intermediários entre elas estão associados a condições em que o fogo é um distúrbio recorrente. A presença de uma estação seca permite

que poáceas se tornem altamente flamáveis, favorecendo a rápida propagação de fogo, principalmente em locais com muito vento (BOND, 2008; GROOT; WARDATI; WANG, 2005). Para essas situações, as poáceas tendem a evitar os efeitos negativos do fogo protegendo seus rizomas e meristemas abaixo do solo ou por densas turfas (SAGE; STATA, 2015).

Dessa maneira, é possível perceber que existem limitações ambientais que permitem a diferenciação de ocorrência entre “não C4” e C4, como no caso do gênero *Oplismenopsis* que possui delimitação clara na região Sul (FIGURA 4, ANEXO). Entretanto, apesar da diferença fotossintética, os gêneros compartilham preferências de faixa de temperatura, altitude, disponibilidade de água e de ocorrência de incêndio. A capacidade de poáceas PACMAD C3 de habitarem regiões similares às ocupadas por C4 seria uma característica capaz de diferenciar estas das C3 Pooideae, onde não existe evolução para via C4 e ocorreram adaptações para estabelecimento em ambientes frios (EDWARDS; SMITH, 2010). Espécies C3 e C4 podem ser encontradas em regiões similares, bem como as espécies intermediárias entre as duas vias (LUNDGREN et al., 2015; LUNDGREN; CHRISTIN, 2016). Ainda assim, mesmo que as espécies C4 compartilhem ambientes similares aos gêneros C3 relacionados, elas possuem a capacidade de se diversificar para uma faixa de ambientes maior, desde que haja condições favoráveis (CHRISTIN; OSBORNE, 2014; LUNDGREN et al., 2015). Assim, as adaptações encontradas em C3 podem contribuir para o surgimento das poáceas C4, bem como seu sucesso da colonização e diversificação (EDWARDS; SMITH, 2010; LUNDGREN et al., 2015).

## **5.2 Pré-adaptações das células da bainha do feixe vascular de poáceas C3 e intermediárias do clado *Arthropogoninae* facilitam o surgimento da via C4**

Todas as poáceas C3 e intermediárias analisadas apresentam duas camadas de células BFV ao redor do feixe vascular (FIGURAS 7 e 8; 5 e 6, ANEXO), enquanto as C4 possuem apenas uma camada de células BFV (FIGURAS 9; 7 e 8, ANEXO). Em poáceas, as células da bainha podem estar organizadas em uma ou duas camadas, e apesar da sua convergência funcional, nem todas elas são homólogas em relação à sua origem (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014). Assim, essas células podem ter uma origem interna, provenientes do procâmbio, ou externa, provenientes do meristema fundamental (SAGE, 2004; SOROS, DENGLER, 2001). Nas espécies com duas camadas, a camada interna é chamada bainha mestomática, apresentando células de diâmetro menor com paredes espessas e, algumas vezes, assimétricas e localização entre o tecido vascular e a camada de célula de origem parenquimatosa (DENGLER; DENGLER; HATTERSLEY, 1985; HATTERSLEY; WATSON, 1976; MIYAKE, 2016). Em relação às C4, a bainha mestomática está geralmente associada às poáceas do tipo NAD-ME e PCK, sendo ausentes em NADP-ME (HATTERSLEY; WATSON, 1976), onde a camada externa é perdida. Essa última enzima descarboxilativa se trata do tipo utilizado em todos os gêneros C4 do clado *Arthropogoninae* (MORRONE et al., 2012).

As primeiras etapas para que ocorra a evolução da via C4 são modificações foliares, como o estabelecimento de anatomia Kranz (GOWIK; WESTHOFF, 2011), caracterizada por camadas de células concêntricas organizadas em torno dos feixes vasculares, sendo a interna formada por células da bainha do feixe vascular e a externa por células do mesofilo (EDWARDS; VOZNESENSKAYA, 2011; SAGE, 2004). É necessário que o compartimento

responsável pela assimilação do carbono, em geral as células do mesofilo e o compartimento responsável pela redução do carbono, células da bainha do feixe vascular, se encontrem próximas a fim de promover o mecanismo concentrador de carbono ao redor do sítio da Rubisco (GOWIK; WESTHOFF, 2011).

Os dados para as espécies analisadas mostram uma diminuição na distância entre os feixes vasculares na medida em que as espécies passam a adquirir caracteres similares ao da anatomia C4 (FIGURAS 6 e 10). A diminuição na distância entre os feixes vasculares, reduzindo as poucas células do mesofilo possibilita que os compartimentos onde se encontram a Rubisco e a PEPc troquem metabólitos (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014). Dessa forma, as espécies intermediárias *H. isocalyca*, *H. aturensis* e *H. longispicula*, que representam etapas dessa evolução, apresentam diminuição significativa na distância entre feixes vasculares e no número de células M entre eles, em relação à C3 *H. glutinosa*, além de redução da razão M:BFV e aumento da porcentagem de células BFV (FIGURAS 10 E 11). Redução similar nas distâncias entre os feixes vasculares também pode ser observada para as do “tipo C3” *H. villaricensis*, *A. cipoensis* e *C. lanceolata* (FIGURA 6).

Os gêneros dessas espécies estão relacionados a grupos onde a via C4 evoluiu. O *Homolepis* forma uma clado irmão com *Mesosetum*, gênero C4, além de se relacionar filogeneticamente com *Tatianyx arnacites*, outra espécie C4 (FIGURA 2). Já os gêneros *Apochloa* e *Canastra* possuem relação filogenética com *Coleataenia*, também classificado como C4 (FIGURA 2; GPWG II, 2012). Assim, a redução da distância entre feixes vasculares nas espécies *H. villaricensis*, *A. cipoensis* e *C. lanceolata* poderia indicar a existência de mais pontos transitórios entre as vias C3 e C4 nesse clado.

Vale ressaltar que, apesar de ser uma variável importante na evolução C4, a distância entre os feixes vasculares pode ser uma medida relativa, uma vez que grandes distâncias podem ser ocupadas por apenas uma célula, como no

caso da poácea *Alloteropsis cimicina* (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014). Entre as espécies analisadas, a C4 *A. piptostachya* possui uma distância entre os feixes vasculares que é praticamente o dobro do valor para as outras C4 do mesmo clado (FIGURA 6). Nesse caso, a presença de células distintas entre os feixes vasculares poderia explicar a maior distância sem, necessariamente, haver um comprometimento de sua atividade como C4 (FIGURA 7- A e B, ANEXO). Células distintas possuem paredes espessadas e funcionam, do ponto de vista bioquímico, de maneira similar às células da bainha (DENGLER et al., 1994; HATTERSLEY; BROWNING, 1981), servindo como compartimentos extras para a realização do ciclo de Calvin (CHRISTIN et al., 2013a).

Já para *H. glutinosa*, a maior distância entre os feixes vasculares, mesmo quando comparados às C3 do gênero *Apochloa*, se deve a presença de células fusóides (FIGURA 7-E). Essas células não possuem função fotossintética e sua ocorrência é comum em bambus, sendo essa característica responsável por uma menor proporção de células do mesófilo por células da bainha do feixe vascular (DENGLER et al., 1994). Ainda assim, esse tipo celular não parece ser uma característica envolvida na evolução da via C4. Para *H. aturensis*, nas seções de material herborizado (FIGURA 1-C, ANEXO) observou-se, esse tipo celular, bem como Christin et al. (2013b) apresentaram uma secção foliar desta espécie com a presença de células fusóides. Dessa maneira, as células fusóides parecem estar associadas principalmente às condições dos ambientes de crescimento, como locais sombreados, servindo para aumentar a porção de radiação absorvida nas células do mesófilo, da mesma maneira que o parênquima esponjoso funciona (MARCH; CLARK, 2011).

As espécies C3 e intermediárias possuem arranjo das células M e BFV ao redor dos feixes vasculares, sendo que as BFV são relativamente grandes (FIGURAS 7 e 8; 5 e 6, ANEXO). A presença de células BFV grandes e com

arranjo radial ao redor do feixe vascular pode ser considerada uma forma rústica de funcionalidade da anatomia Kranz (MUHAIDAT et al., 2011; SAGE, 2001), com a exceção de que estas não são rodeadas por uma camada de células do mesofilo (RAWSTHORNE, 1992). Esse arranjo concêntrico de células pode ser observado em diversas poáceas C3, sendo que na família Poaceae essas espécies geralmente estão relacionadas com representantes C4 (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014). Além do arranjo, o aumento do tamanho de células da bainha do feixe vascular e modificações no funcionamento são considerados etapas da evolução C4 (GOWIK; WESTHOFF, 2011; MUHAIDAT et al., 2011).

As células da bainha possuem funções relacionadas com o suprimento de água (GRIFFITHS et al., 2013), principalmente em poáceas C3 distribuídas em regiões secas e quentes (revisado por SAGE, 2001). Poáceas C3 PACMAD possuem alta tolerância ao aumento da demanda evaporativa, por meio do aumento do tamanho dessas células (GRIFFITHS et al., 2013), sendo esse maior tamanho de células BFV observado para as C3 e intermediárias estudadas, provavelmente relacionado com o controle hídrico foliar. As células BFV aumentadas nas espécies do gênero *Apochloa* e em *H. isocalycia* e *H. longispicula* estão ligadas à ocorrência do gênero associada a localidades com elevada probabilidade de seca (FIGURAS 4, 7 e 8). As células da bainha poderiam reservar água para condições de alta temperatura e/ou baixa umidade, por meio do controle da quantidade de água que vai para as células do mesofilo, mantendo a integridade hidráulica foliar (GRIFFITHS et al., 2013; OSBORNE; SACK, 2012; SAGE, 2001). Também possuem o papel de prevenir a entrada de ar no xilema quando a coluna de água é submetida à condição de alta tensão, além de mediar o transporte de material entre o tecido vascular e as células do mesofilo (SAGE, 2001).



Células da bainha envolvidas na reserva de água têm sido reconhecidas como pré-disposição para evolução da via C4 (SAGE, 2001), uma vez que esse mecanismo forneceria às espécies C3, filogeneticamente relacionadas com C4, vantagens em ambientes tropicais e subtropicais (GRIFFITHS et al., 2013). Dessa maneira, pode-se inferir que o aumento da demanda evaporativa dos ambientes onde as poáceas C4 ocorrem, foi um fator para a expansão desses ecossistemas dominados por essas plantas (OSBORNE; SACK, 2012). Além das modificações relacionadas com as células BFV, pode-se perceber a quantidade do mesofilo, como observado em folhas de *A. euprepes* e *H. longispicula* que reduziram a razão M:BFV (FIGURA 11). A redução da quantidade de células do mesofilo seria uma estratégia para a diminuição da superfície evaporativa, reduzindo o risco de dessecação (SAGE, 2001).

Ao contrário das espécies C3 desse clado, as células BFV das C4 apresentam um tamanho reduzido, porém em maior número (FIGURAS 9; 7 e 8, ANEXO). Células da bainha de origem procambial parecem atingir um menor volume máximo (DENGLER; DENGLER; HATTERSLEY, 1985; DENGLER et al., 1994), sendo esse padrão também observado em folhas de *Axonopus compressus*, em que as células da bainha são pequenas, entretanto numerosas (LUNDGREN; OSBORNE; CHRISTIN, 2014). Essa característica pode estar relacionada com o atraso da diferenciação celular das células do mesofilo que aumenta a iniciação de tecido vascular e contribui para maior densidade de feixes vasculares (KÜLAHOGLU et al., 2014). Essas espécies C4 alcançaram maior quantidade de compartimentos com ciclo de Calvin, por meio da maior proliferação celular, ao invés de controlar o tamanho das células (CHRISTIN et al., 2013a), parecendo ser uma estratégia do clado que as espécies C4 apresentem células BFV menores, porém em maior quantidade.

Essa diminuição do tamanho celular faz com que menor quantidade de tecido esteja envolvida na redução de CO<sub>2</sub> em plantas C4 do tipo NADP-ME,

em comparação aos outros tipos C4 (DENGLER et al., 1994). Entretanto, isso não resulta na diminuição da eficiência fotossintética destas, uma vez que foi possível identificar a suberização da lamela média das células BFV em *M. ferrugineum* (FIGURA 12-C). A presença de lamela média suberizada em poáceas que utilizam a enzima descarboxilativa NADP-ME faz com que haja redução das perdas apoplásticas de CO<sub>2</sub>, além de limitar a fonte de carbono aos ácidos orgânicos provenientes das células do mesófilo (HATTERSLEY; BROWNING, 1981). Além disso, o tipo NADP-ME utiliza, predominantemente, cloroplastos para as atividades metabólicas da célula da bainha, não necessitando de muito mais “espaço extra” para outras organelas como mitocôndrias e peroxissomos (revisado por DENGLER et al., 1994). A posição centrífuga dos cloroplastos também é outra característica comum nesse tipo C4, capaz de promover a diminuição da distância entre o tecido de assimilação e o de redução de CO<sub>2</sub> (HATTERSLEY; BROWNING, 1981).

Na espécie *M. ferrugineum* pode-se notar maior formação de grãos de amido nas células BFV em relação às M (FIGURAS 14-C; 12-C, ANEXO), sendo que nas espécies C3 e nas duas intermediárias *H. isocalycia* e *H. aturensis* existem grãos de amido formados nas células BFV (FIGURAS 12 e 14; 11, ANEXO). Nas plantas C4, as células BFV acumulam amido, não somente por causa da atividade fotossintética, mas pela localização das enzimas de biossíntese de amido nesse compartimento (MIYAKE, 2016; WEISE; WIJIK; SHARKEY, 2011), de modo que essa molécula serve como fonte de fosfato inorgânico para o metabolismo celular (WEISE, WIJIK; SHARKEY, 2011). Dessa forma, a presença de cloroplastos capazes de produzir e acumular amido nas células da bainha em plantas C3 e intermediárias seria outra pré-condição que favoreceria a evolução da via C4 nessas espécies (WEISE; WIJIK; SHARKEY, 2011; MIYAKE, 2016). Outro requerimento para a via C4 pode ser encontrado em plantas intermediárias, que possuem cloroplastos das células da

bainha de plantas intermediárias com capacidade de coletar radiação e gerar elevadas quantidades de ATP (BELLASIO; LUNDGREN, 2016).

Para as espécies C3 e intermediárias, além da localização da Rubisco nas células BFV (FIGURA 11, ANEXO), alguns cloroplastos se encontram situados em regiões que lhes permite fazer contato com espaços intercelulares (FIGURAS 7 e 8; 5 e 6, ANEXO), possibilitando a fixação de CO<sub>2</sub> presentes nesses espaços. Já para as espécies *H. longispicula*, *H. villaricensis*, *A. molinioides*, *O. najada* e *P. gymnocarpum*, apesar de não poder afirmar em relação à presença de Rubisco, é possível perceber que suas células BFV possuem algumas organelas mais evidentes em relação às outras C3 do mesmo grupo. Assim, além do mesofilo, as células da bainha do feixe vascular, principalmente em intermediárias, têm a capacidade de fixar e reduzir CO<sub>2</sub>, o que está relacionado com a ativação desse tipo celular e seu envolvimento na atividade fotossintética (GOWIK; WESTHOFF, 2011; SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

Entretanto, apesar da função fotossintética relacionada à célula da bainha, o CO<sub>2</sub> que é liberado pela atividade fotorrespiratória pode escapar sem ser refixado (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014), sendo necessária a presença de um aparato, incluindo a enzima glicina descarboxilase nessas células a fim de metabolizar as moléculas de glicina. Dessa forma, a anatomia foliar de poáceas C3 relacionadas a gêneros C4 possuem diversas adaptações que podem ser consideradas essenciais para a evolução dessa via. Entretanto, o envolvimento das células BFV na função fotossintética, além de ser o ponto mais estudado, parece ser o que oferece maior suporte para explicar a evolução C4.

### 5.3 O rearranjo de organelas e de distribuição enzimática no clado

#### *Homolepis-Mesosetum* representam etapas no surgimento da via C4

O aumento da densidade de feixes vasculares e do tamanho e ativação das células da bainha são considerados fases iniciais da evolução C4, sendo a metabolização de glicina na célula da bainha a etapa subsequente (GOWIK; WESTHOFF, 2011; SAGE, 2004). Apesar das células da bainha de plantas C3 não contribuírem para elevadas taxas fotossintéticas, uma vez que não possuem elevada capacidade de regenerar a Ribulose-1,5-Bifosfato (BELLASIO; LUNDGREN, 2016), a presença de Rubisco permite inferir a ativação das células da bainha e sua integração à fotossíntese (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Essa participação na atividade fotossintética trouxe a necessidade de aumento da densidade de organelas nesse compartimento celular (GOWIK; WESTHOFF, 2011).

Nas células BFV de C3, modificações de distribuição de organelas começam a ocorrer principalmente quando essas espécies estão relacionadas a gêneros C4. Assim, ainda que em menor quantidade, grande parte das mitocôndrias e cerca de 40% dos cloroplastos localizam-se de forma centrípeta na porção interna da célula BFV (TABELA 7, ANEXO). Valores similares foram encontrados para outras espécies de poáceas C3 por Hatakeyama e Ueno (2016). A presença de GDC nas células BFV das espécies de *Apochoa* evidencia a expressão dessa enzima nesse compartimento, ainda que em baixa quantidade (FIGURA 12-B e D; 16-B; TABELA 6, ANEXO). O mesmo foi observado para *H. glutinosa*, apesar de não ter sido feita quantificação (FIGURA 10, ANEXO). A expressão de GDC nas células da bainha de plantas C3 não é uma característica generalizada (SCHULZE et al., 2013). Assim, quando as células da bainha C3 apresentam GDC considera-se uma pré-condição apresentada para a evolução C4, indicando que os genes responsáveis pela expressão dessa enzima também apresentam uma especificidade por esse

compartimento celular, característica importante em etapas subsequentes (SAGE; CHRISTIN; EDWARDS, 2011; SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012; SCHULZE et al., 2013; SCHULZE; WESTHOFF; GOWIK, 2016).

As espécies intermediárias, *H. isocalycia* e *H. aturensis*, possuem aumento significativo na área coberta por cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos nas células BFV, em relação às espécies C3 *A. euprepes* e *A. poliophylla* (FIGURA 15-A, C e D). O mesmo pode ser inferido a partir das secções anatômicas de *H. longispicula* (FIGURA 9, ANEXO). Em *H. isocalycia*, houve o aumento em 8 vezes da área ocupada por peroxissomos em células BFV, além da densidade de mitocôndrias aumentar em mais de 6 vezes em relação às C3 analisadas, permitindo maior quantidade de GDC. Mais da metade dessas organelas são adjacentes aos tecidos vasculares e a posição é centrípeta (FIGURA 12-E). A posição interna das mitocôndrias diminui a perda de CO<sub>2</sub> fotorespiratório e respiratório, por meio do aumento da distância que essa molécula teria que percorrer (HATAKEYAMA; UENO, 2016; RAWSTHORNE, 1992), sendo isso uma resposta à nova função das células da bainha em metabolizar glicina (MUHAIDAT et al., 2011). Essas modificações permitem classificar a *H. isocalycia* como uma espécie C3 do tipo proto-Kranz. Padrão semelhante é encontrado em *Steinchisma laxa* (KHOSHRAVESH et al., 2016; SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014), bem como para as espécies *Flaveria pringlei* e *F. robusta* (SAGE et al., 2013).

Como descrito por Khoshravesh et al. (2016), o aumento da área coberta por organelas em *H. aturensis* nas células da bainha é acompanhado pela expressão de GDC quase que exclusiva a esse compartimento, permitindo classificá-la como uma espécie C2. Em *H. longispicula* percebe-se que a maior parte das organelas das células BFV encontram-se associados à sua porção interna (FIGURA 9, ANEXO). Em relação à presença de GDC, *H. longispicula* apresentou padrão similar à *H. aturensis*, onde essa enzima é confinada à célula

BFV (observações pessoais). Resultados similares foram observados para as eudicotiledôneas *Cleome paradoxa* (VOZNESENSKAYA et al., 2007) e *Flaveria sonorensis* e *F. angustifolia* (SAGE et al., 2013). No contexto do clado *Homolepis/Mesosetum*, *H. aturensis*, aumentou em 3 vezes a área coberta por cloroplastos, em 4 vezes a área de peroxissomos e quase dobrou a mitocondrial nas células BFV e relação *H. isocalycia*. A associação das organelas à porção interna é ainda mais evidente, sendo que quase 100% das mitocôndrias e peroxissomos estão nessa área da célula, como uma camada de cloroplastos mais externa (TABELA 7, ANEXO; FIGURA 14-A). Os cloroplastos distribuídos centripetalmente, formam uma barreira ao redor da parede celular, de modo a garantir que grande parte do CO<sub>2</sub> proveniente da descarboxilação da glicina seja refixado pela Rubisco (MONSON; RAWSTHORNE, 2000; RAWSTHORNE et al., 1988; SAGE, 2004). Essa modificação na posição das organelas para a parte interna das células da bainha do feixe força a refixação de CO<sub>2</sub> e é considerada uma modificação importante para a via C4 (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

Os menores valores de imunomarcagem da GDC para *H. aturensis* em células BFV (FIGURA 16-B), pode ser decorrente da maior área desta que representa quase o dobro do tamanho em relação à *H. isocalycia*. O aumento das células da bainha e seu engajamento na atividade fotossintética compensam a redução das células do mesófilo (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Além disso, plantas C2 possuem sensibilidade reduzida ao O<sub>2</sub> (DAI; KU; EDWARDS, 1996), além de células da bainha com maior resistência, auxiliando a manutenção de elevados valores de pressão parcial de CO<sub>2</sub> (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016; VON CAEMMERER, 2000). Então, mesmo que a GDC esteja em menor quantidade, as adaptações descritas auxiliam a célula BFV a funcionar de maneira mais eficiente no que diz respeito à fixação de CO<sub>2</sub>.

Dessa maneira, o gênero *Homolepis* apresenta duas espécies que possuem valores elevados de GDC nas células BFV. Isso confirma o papel do transporte de glicina como uma etapa fundamental para a evolução da via C4 (MUHAIDAT et al., 2011). O aumento do número de cloroplastos e da área por eles ocupada nas células da bainha de plantas intermediárias é considerado um *driver* para o aumento de volume dessa organela em células da bainha de plantas C4, como observado no gênero *Flaveria* (STATA et al., 2016). A espécie *M. ferrugineum* apresenta o dobro da área de célula BFV coberta por cloroplastos em relação à *H. aturensis*, sendo estes associados à parede externa (FIGURA 14-C; TABELA 7, ANEXO). Pode-se observar o mesmo para *M. loliiforme*, onde a maior parte das organelas se encontram associadas à parte externa das células BFV (FIGURA 9-C e D). Nesse caso, esse posicionamento auxilia na captura dos metabólitos provenientes da célula do mesofilo (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

Além de movimentar carbono, o transporte de glicina também move nitrogênio ao liberar uma molécula de amônia, havendo necessidade de re-balanceamento no metabolismo de nitrogênio (MONSON; RAWSTHORNE, 2000). Assim, essa amônia liberada é refixada na célula da bainha e pode então se movimentar de volta para a célula do mesofilo na forma de aminoácido (MALLMANN et al., 2014). Para isso, seria utilizada a glutamina sintase-glutamato sintetase, uma vez que espécies intermediárias expressam essas enzimas (MALLMANN et al., 2014; SCHULZE; WESTHOFF; GOWIK, 2016). Além disso, algumas modificações no transporte de metabólitos já estão associadas com o ciclo C4, criando pressão seletiva para a persistência dessa via (MALLMANN et al., 2014).

Muita atenção é dada às condições existentes em células BFV de plantas C3 que favorecem a evolução C4, entretanto modificações nas células M também auxiliam nessa transição entre vias. Nas células do mesofilo das C3, um

maior número de mitocôndrias e de peroxissomos foram localizados em posições mais internas ao cloroplasto (FIGURA 12-B e D). Esse posicionamento está relacionado com o mecanismo de reaproveitamento do CO<sub>2</sub>, além de auxiliar na incorporação da NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pela glutamina sintase-glutamato sintetase (HATAKEYAMA; UENO, 2016). Sendo esse padrão similar ao observado na intermediária *H. isocalycia* (FIGURA 12-F), pode-se inferir que para essa espécie não existe diferenças em termos de organelas nas células M, quando comparada às C3 do mesmo clado.

Da mesma forma que para as espécies *Steinchisma laxa* (proto-Kranz) e *Steinchisma hians* (C2) (KHOSHRAVESH et al., 2016), pode-se notar redução na quantidade de mitocôndrias e quantidade de GDC nas células M entre *H. isocalycia* e *H. aturensis*. Padrão similar é observado para eudicotiledôneas do gênero *Flaveria* e *Heliotropium* (MUHAIDAT et al., 2011; SAGE et al., 2013). Uma vez que a quantidade de organelas nas células BFV em *H. aturensis* é incrementada, a metabolização da glicina se torna restrita a esse compartimento, a redução da quantidade de organelas referentes ao mesofilo significa economia de investimento metabólico. O posicionamento dos cloroplastos associados à membrana plasmática é uma estratégia para diminuir a resistência da difusão associada com a fase líquida do citoplasma (EVANS et al., 2009), sendo esta uma característica observada nas células M das espécies C3 e da proto-Kranz *H. isocalycia* (FIGURA 12-F).

Já em *M. ferrugineum*, apesar dos cloroplastos serem aparentemente periféricos nas células M, ao observar as imagens de ultraestrutura, percebe-se que existe uma faixa citoplasmática entre a posição cloroplastídica e a membrana plasmática (FIGURA 12-D, ANEXO). Como em plantas C4 a assimilação de CO<sub>2</sub> ocorre via PEPc, posicionada no citoplasma, a associação de cloroplastos à membrana plasmática reduziria o acesso ao sítio enzimático dessa enzima carboxilativa primária (STATA et al., 2014; STATA et al., 2016). As



imagens para *H. aturensis* apresentaram similaridade no posicionamento dos cloroplastos nas células M (FIGURA 14-B) e isso poderia ser um indicativo de que essa espécie intermediária assimila CO<sub>2</sub> via PEPc, apresentando um ciclo C4, ainda que não completamente expresso. Para confirmação disso, ensaios enzimáticos e imunomarcção para essa enzima são requeridos. A ausência de Rubisco nas células do mesofilo de plantas C4 diminuiria a fotorrespiração desse compartimento, de modo que os cloroplastos não precisariam estar próximos da membrana plasmática para recaptura de CO<sub>2</sub> (STATA et al., 2014).

Além do posicionamento, a quantidade de área coberta por cloroplastos nas células M é bastante reduzida na espécie C4 (FIGURA 13-A, C e D). Essa diminuição de cobertura celular, bem como modificação na posição contribui para um melhor funcionamento do ciclo C4 (STATA et al., 2014). As células do mesofilo de plantas C4 investem em um menor número de cloroplastos, de modo a diminuir o sombreamento em relação às células da bainha, permitindo a absorção de radiação (BELLASIO; LUNDGREN, 2016; STATA et al., 2014; STATA et al., 2016). Apesar da menor quantidade, os cloroplastos nas células do mesofilo são eficientes, uma vez que são responsáveis por exportar poder redutor para as células da bainha, por conta da depleção de fotossistema II nestas (FURBANK, 2011). A transferência de energia a partir das células do mesofilo permite a elas reduzir a demanda energética, tendo como consequência o menor investimento em cloroplastos (STATA et al., 2014).

#### **5.4 A glicina descarboxilase modifica a relação isotópica de carbono e reduz o ponto de compensação de CO<sub>2</sub>**

Os  $\delta^{13}\text{C}$  para as poáceas “tipo C4” estudadas variaram entre -14 e -10‰ (TABELA 1), o que está de acordo com a faixa de valores encontrados para plantas C4 (-14 e -11‰) (CERLING et al., 1997). Os valores de isótopos de carbono para plantas C4 podem variar de acordo com os diferentes tipos de

enzimas descarboxilativas (EHLERINGER; CERLING; HELLIKER, 1997) ou por conta da condição de vazamento da célula da bainha (FARQUHAR, 1983; HENDERSON; VON CAEMMERER, 1992). Esse vazamento é definido como a quantidade de CO<sub>2</sub> que é fixado pela PEPc nas células do mesófilo, entretanto perdida subsequentemente pelas células da bainha (FARQUHAR, 1983). Dessa maneira, ainda que a discriminação pela PEPc contra o <sup>13</sup>C seja considerada de 2,2‰ (O'LEARY, 1981) e o carbono entregue a partir de ácidos de quatro carbonos na célula da bainha sejam enriquecidos em <sup>13</sup>C (SAGE, 2016), o vazamento torna os valores finais mais negativos. Esse vazamento da célula da bainha determina a influência da Rubisco no fracionamento de carbono em plantas C4 (CERNUSAK et al., 2013).

As espécies C4 classificadas na subtribo Arthropogoninae utilizam a NADP-ME como enzima descarboxilativa nas células da bainha (MORRONE et al., 2012), possuindo características específicas em relação à discriminação isotópica de carbono. Como observado para *M. ferrugineum* (-11, 6‰), as células BFV possuem lamelas médias suberizadas (FIGURA 12-C, ANEXO). A presença de lamela média suberizada seria responsável pela redução da condutância do CO<sub>2</sub> através das células da bainha (COUSINS; BADGER; VON CAEMMERER, 2008; FARQUHAR, 1983), permitindo sua alta concentração nesse compartimento celular. Outra característica relativa ao tipo NADP-ME que influencia a discriminação isotópica é que o NADPH formado via descarboxilação dos ácidos de quatro carbonos reduz o requerimento de fotossistema II e, conseqüentemente, de centros de evolução de oxigênio nesse tipo de célula (FARQUHAR, 1983), o que contribui para menor discriminação característica a esse tipo de C4.

Entre os valores observados para todas as espécies classificadas como C3 podem estar inclusas C3 proto-Kranz, C2 ou até mesmo C4-like. Apesar de duas espécies de *Apochloa* serem classificadas como C3 de acordo com os

resultados de imunomarcção apresentados, valor de menor discriminação (-23,1‰) para *A. eligulata* poderia indicar a presença de espécies intermediárias, com presença de PEPc envolvida na fotossíntese (TABELA 1). A presença dos dois tipos de enzimas carboxilativas no mesmo compartimento celular é uma característica comum em espécies intermediárias de *Flaveria* (REED; CHOLLET, 1985), bem como em fenótipos intermediários de *Alloteropsis semialata* (LUNDGREN et al., 2016). Entretanto, o uso exclusivo de dados de  $\delta^{13}\text{C}$  como caracterização de intermediárias ainda não se mostra eficaz, uma vez que os valores para essas espécies tendem a um perfil C3, reflexo da compartimentalização incompleta das vias fotossintéticas (ALONSO-CANTABRANA; VON CAEMMERER, 2016; MONSON et al., 1988; VON CAEMMERER et al., 2014). Assim são necessárias análises de localização e atividade da PEPc para confirmação do metabolismo fotossintético.

Pode-se notar diferenças entre  $\delta^{13}\text{C}$  das espécies do gênero *Homolepis*, o que em conjunto com os demais dados coletados poderiam ratificar as diferenças nos tipos fotossintéticos. A espécie *H. glutinosa* apresenta discriminação de -29,6‰ e  $\Gamma$  de 46,1  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (TABELAS 1 e 2), sendo esses valores considerados padrão para plantas C3. Esse valor de  $\Gamma$  em plantas C3 está provavelmente relacionado com a atividade carboxilase e oxigenase da Rubisco, consequência da elevada pressão parcial de  $\text{O}_2$  (DAI; KU; EDWARDS, 1996). Poáceas C3 *Dicanthelium oligosanthos* e *Panicum bisulcatum* apresentaram  $C^*$  de 48 e 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (KHOSHRAVESH et al., 2016) enquanto para os fenótipos C3 de *A. semialata* o  $\Gamma$  foi de 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (LUNDGREN et al., 2016).

Apesar de não significativa, pode-se observar uma redução do  $\Gamma$  (38,7  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) para *H. isocalycia* (TABELA 2). Espécies proto-Kranz geralmente possuem ponto de compensação similar à C3 (RAWSTHORNE, 1992), entretanto a quantidade significativa de GDC na célula da bainha poderia ser

responsável pela modificação de características relacionadas às trocas gasosas (VON CAEMMERER, 1989). Embora haja essa redução, o valor de isótopo de carbono em matéria seca (-28,1‰) foi similar ao encontrado para a C3 (TABELA 1). Em plantas com essa variação metabólica, o CO<sub>2</sub> é fixado pela Rubisco tanto nas células do mesofilo quanto nas células da bainha, havendo discriminação por essa enzima carboxilativa em ambos os compartimentos celulares (VON CAEMMERER, 1989; VON CAEMMERER; HUBICK, 1989). Como o transporte de glicina não é um mecanismo completo em proto-Kranz, a refixação do CO<sub>2</sub> nas células BFV reflete na diminuição do  $\Gamma$ , entretanto não modifica a discriminação de isótopos.

Para *H. aturensis*, houve redução significativa do  $\Gamma$  (15,7  $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) em relação à C3 (TABELA 2), como reflexo do rearranjo de organelas descrito anteriormente. Apesar da Rubisco presente na célula do mesofilo fixar CO<sub>2</sub> da mesma maneira que a C3, na célula da bainha do feixe essa mesma enzima é exposta ao fluxo de glicina proveniente do mesofilo e conseqüentemente ao CO<sub>2</sub> proveniente de sua descarboxilação (VON CAEMMERER; HUBICK, 1989). A pressão parcial de CO<sub>2</sub> das células da bainha é inversamente proporcional à do mesofilo, uma vez que a quantidade de glicina é determinada pela taxa de oxigenação da Rubisco (LEEGOOD; VON CAEMMERER, 1994; VON CAEMMERER, 1992; VON CAEMMERER, 2000). Em plantas que possuem metabolismo C2, como a *Flaveria pubescens*, a descarboxilação fotorrespiratória da glicina é uma importante fonte de CO<sub>2</sub>, sendo capaz de triplicar a concentração interna desse gás em relação às espécies C3 (KEERBERG et al., 2014). Nesse contexto, *H. aturensis* apresentou aumento da razão  $C_i/C_a$  em relação à C3 do mesmo gênero (TABELA 2).

A diferença em relação à *H. isocalycia* é que em *H. aturensis* há necessidade de movimentação da glicina da célula do mesofilo para a bainha, já que a GDC é ausente nas células M de espécies C2 (FIGURA 14-B). A presença

do ciclo C2 torna difícil quantificar a contribuição de diferentes vias bioquímicas envolvidas na fotossíntese dessas plantas (ALONSO-CANTABRANA; VON CAEMMERER, 2016; VON CAEMMERER, 1989). Outra possibilidade para explicar a redução dos valores de  $F$  seria a fixação de  $\text{CO}_2$  pela PEPc (VON CAEMMERER, 2000), o que poderia ter relação com o posicionamento de cloroplastos nas células M (FIGURA 14-B). As espécies *Flaveria floridana* e *F. anomala* acumulam ácidos orgânicos de quatro carbonos, indicando atividade da PEPc (MONSON et al., 1986), da mesma forma que para a poácea C2 *S. hians* que apresenta ciclo C4 fraco (EDWARDS; KU; HATCH, 1982). Entretanto, o valor de isótopos de carbono não confirma essa hipótese, uma vez que -31,0% estariam relacionados com o metabolismo C2 do tipo I, em que não há a participação de etapas envolvidas no ciclo C4. Diferente do ciclo C4, o carbono entregue pela descarboxilação da glicina a Rubisco é pobre em  $^{13}\text{C}$ , de modo a reduzir valores de discriminação isotópica de carbono (GILLON; GRIFFITHS, 1997; SAGE, 2016). Além disso, valores de  $F$  característicos para plantas C2 do Tipo II são menores que  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$  (VOGAN; FROHLICH; SAGE, 2007).

Em relação à  $EC$ , a C3 *H. glutinosa* apresenta maiores valores em relação à C2 *H. aturensis* (TABELA 2). Mesmo que plantas intermediárias possuam menores pontos de compensação de  $\text{CO}_2$  em comparação às C3, a eficiência de carboxilação nunca atinge valores próximos aos encontrados em plantas C4 (DAI; KU; EDWARDS, 1996; LUNDGREN et al., 2016). A ocorrência de valores de eficiência carboxilativa similares à C4 em plantas intermediárias, seria um indicativo de ciclo C4, ainda que fraco (LUNDGREN et al., 2016), sendo essa outra razão para explicar a provável inexistência de ciclo C4 em *H. aturensis*.

Já para *H. longispicula* observou-se aumento de  $\delta^{13}\text{C}$  (-27,5‰) em relação à C3 (TABELA 1). Uma vez que essa espécie possui expressão de GDC

apenas na célula da bainha (observações pessoais), ela pode ser classificada como uma C2. Entretanto, diferente da *H. aturensis*, a discriminação da *H. longispicula*, poderia indicar integração com o ciclo C4. Estudos com *F. floridana*, intermediária C2 Tipo II, demonstram que em baixas concentrações de CO<sub>2</sub>, o ciclo C4 pode contribuir em até 21% na fixação de carbono (ALONSO-CANTABRANA; VON CAEMMERER, 2016). Apesar disso, este ainda pode possuir uma baixa atividade, que pode ser decorrente do baixo *turnover* de enzimas, como a PEPc (PEISKER, 1986), bem como à menor eficiência em transferir carbono entre os ciclos C4 e C3 (MONSON et al., 1986, 1988; REED; CHOLLET, 1985).

Os valores de vazamento da célula da bainha para plantas intermediárias são maiores do que para plantas com ciclo C4 completamente expresso e trata-se de um dos principais fatores que influenciam a discriminação (FARQUHAR, 1983). A compartimentalização incompleta das enzimas Rubisco e PEPc, que podem estar presentes em ambos os tipos celulares, permite que a Rubisco assimile CO<sub>2</sub> em um sistema aberto resultando numa maior discriminação contra o <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, podendo isso explicar porque valores de isótopo de carbono em plantas intermediárias são similares às C3, apesar de poder haver assimilação pelo ciclo C4 (MONSON et al., 1986). Esses fatores reduzem a eficácia do mecanismo concentrador de carbono ao redor do sítio da Rubisco (ALONSO-CANTABRANA; VON CAEMMERER, 2016).

Para *H. villaricensis*, o valor de -32,0‰ seria típico de uma C2 do Tipo I (TABELA 1). Entretanto, apesar das imagens anatômicas mostrarem uma distribuição de organelas nas células BFV, sem dados ultraestruturais, enzimáticos e de trocas gasosas não se pode afirmar que essa espécie pertenceria a esse tipo fotossintético, sendo o mesmo válido para *H. longispicula*. Nem todas as espécies classificadas como intermediárias possuem ciclo C4 (PEISKER, 1986), entretanto as modificações bioquímicas relativas ao

metabolismo da glicina parecem ser comuns em todas elas (DAI; KU; EDWARDS, 1996), como demonstrado para *H. isocalycia*, *H. aturensis* e *H. longispicula*. A presença de GDC, sua especificidade pela célula BFV e sua atividade como descarboxilase são capazes de modificar a assimilação de carbono para essas espécies.

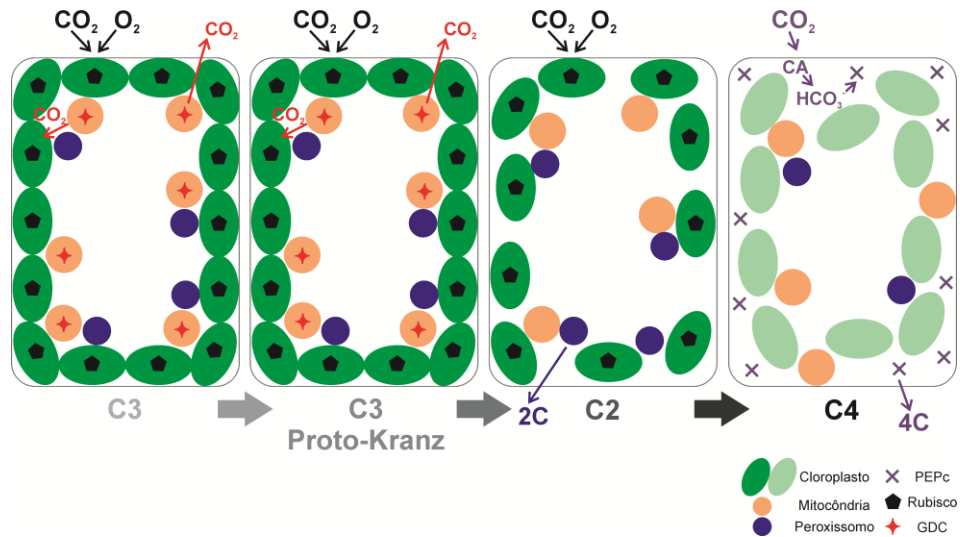
Dessa forma, apesar dos valores de discriminação dos isótopos de carbono integrar o fracionamento de carbono relativo à difusão de CO<sub>2</sub>, atividade da Rubisco e PEPC, bem como outras etapas do metabolismo do vegetal (CERNUSAK et al., 2013; VON CAEMMERER et al., 2014; SAGE, 2016), são resultados que permitem inferir sobre a assimilação de carbono quando utilizados em conjunto com outros dados. Estudos têm observado que plantas bem adaptadas a variações na concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> em diferentes ambientes de crescimento, conseguem manter os valores de *Ci/Ca* relativamente constantes (FRANKS et al., 2013). Alguns resultados demonstram que as medidas de isótopos de carbono de curto prazo ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) são diretamente relacionadas com medidas realizadas em matéria seca (GILLON; GRIFFITHS, 1997). Assim, apesar de características ambientais modificarem os valores de isótopos de carbono entre diferentes espécies, a fisiologia interna de cada uma delas pode restringir esse tipo de variação (CERNUSAK et al., 2013).

### **5.5 As características intermediárias de *Homolepis isocalycia* e *H. aturensis* faz do clado *Homolepis-Mesosetum* um modelo anatômico e bioquímico de evolução C4 em poáceas**

O clado *Homolepis/Mesosetum* apresenta etapas entre as vias C3 e C4, representadas pelas espécies *H. isocalycia*, *H. aturensis* e *H. longispicula* (FIGURA 18 e 19). As poáceas representam algumas das linhagens mais antigas onde a evolução C4 ocorreu (EDWARDS et al., 2010), podendo este ser um motivo para a baixa quantidade de espécies intermediárias encontradas em

monocotiledôneas quando comparado às eudicotiledôneas. O fato de serem encontradas diversas transições entre as vias C3 e C4 no gênero *Flaveria* indica que por ser um gênero recente na história evolutiva ele ainda está em processo de evolução (SCHULZE et al., 2013). Uma vez que não somente caracteres fisiológicos, mas também peculiaridades da ecologia afetam a trajetória evolutiva desses grupos (LUNDGREN et al., 2015), estudos de datação molecular das espécies do clado *Homolepis/Mesosetum* seriam importantes para entender as condições ambientais durante o surgimento dessas espécies transitórias.

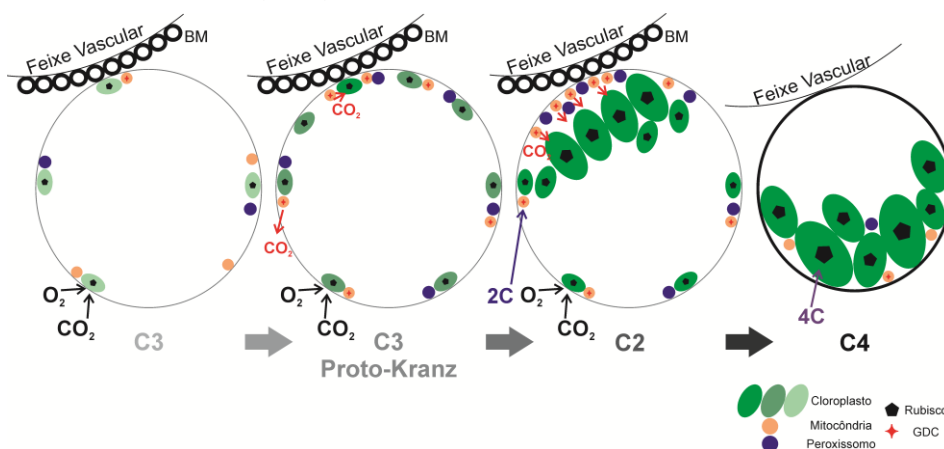
Figura 18 - Esquema de modificações da quantidade e posicionamento de organelas e distribuição enzimática nas células do mesofilo para espécies do clado *Homolepis/Mesosetum*. C3, *Homolepis glutinosa*; C3 proto-Kranz, *Homolepis isocalyca*; C2, *Homolepis aturensis*; C4, *Mesosetum ferrugineum*. 2C, molécula de dois carbonos- Glicina; 4C, molécula de quatro carbonos- Malato; CA, Anidrase Carbônica.





Em uma das quatro ramificações de surgimento C4 da subtribo Arthropogoninae (GPWG II, 2012), existem pelo menos três pontos intermediários no gênero *Homolepis* (FIGURA 18), superando o gênero *Neurachne*, em que apenas a espécie *Neurachne minor* é descrita como C2 do Tipo I (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014). Assim, em comparação às C3 analisadas pode-se perceber uma diminuição do número de organelas associadas a células M nas intermediárias e na C4, culminando na menor quantidade de cloroplastos na espécie *M. ferrugineum*, enquanto o contrário é observado nas células BFV (FIGURAS 13-C, 16-C, 18 e 19). Essa tendência geral está ligada ao reposicionamento de organelas nos tipos celulares M e BS. A Rubisco é gradualmente perdida no mesófilo, na medida em que há aumento da atividade da PEPc (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016; HECKMANN et al.; 2013), permitindo que essa se torne a enzima carboxilativa primária nas C4 (STATA et al., 2016). Já na célula da bainha, o aumento gradual do número de organelas remete ao engajamento desse tipo celular nas atividades fotossintéticas (SAGE; KHOSHRAVESH; SAGE, 2014).

Figura 19 - Esquema de modificações da quantidade e posicionamento de organelas e distribuição enzimática nas células da bainha do feixe vascular para espécies do clado *Homolepis/Mesosetum*. C3, *Homolepis glutinosa*; C3 proto-Kranz, *Homolepis isocalycia*; C2, *Homolepis aturensis*; C4, *Mesosetum ferrugineum*. 2C, molécula de dois carbonos- Glicina; 4C, molécula de quatro carbonos- Malato; BM, bainha mestomática.



Apesar de não ter sido realizada quantificação para a espécie *H. glutinosa*, o posicionamento de GDC praticamente restrito à célula M e a Rubisco em ambos os tipos celulares, além das características de trocas gasosas permitem classificá-la como C3 (FIGURAS 17; 10, ANEXO). Por compartilhar nichos ecológicos similares, poderia inferir que a *H. villaricensis* seria mais uma C3 do gênero (FIGURA 5). Entretanto, a presença de organelas nas células BFV (FIGURA 5-B, ANEXO) e os valores  $\delta^{13}\text{C}$  (TABELA 1) próximos aos encontrados em espécies C2 permitem hipotetizar que este seria mais um ponto intermediário entre as vias C3 e C4. Como já descrito anteriormente, a partir dos resultados obtidos não se é capaz de afirmar o tipo fotossintético dessa espécie.

A relação de *H. isocalycia*, espécie classificada como C3 proto-Kranz (FIGURA 18 e 19), com as C2 e C4 do grupo, suporta essa ideia de evolução. A etapa proto-Kranz é considerada uma etapa inicial para o surgimento da via C2

(SAGE et al., 2013), sendo que as adaptações dessas espécies funcionam como uma forma de aumentar o ganho de carbono foliar, mesmo sob condições altamente fotorrespiratórias (MUHAIDAT et al., 2011). A fotorrespiração é fortemente associada ao aparecimento de plantas C4 (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016; SAGE, 2013), não somente como *driver* para surgimento dessa via, mas também pelo reaproveitamento do CO<sub>2</sub> liberado pela glicina. As células da bainha de espécies proto-Kranz, apesar de ainda “pobres” em relação à quantidade de organelas quando comparadas às C2 e C4 (MUHAIDAT et al., 2011; SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012), já possuem características que integram o metabolismo da glicina (FIGURA 12-E).

A ausência de GDC nas células do mesofilo ocorre de forma gradual, uma vez que os genes responsáveis pela expressão dessas enzimas não são desligados abruptamente (SCHULZE et al., 2013). Dessa maneira, assim como observado no modelo de evolução C4 em eudicotiledôneas, *Flaveria*, existe essa etapa intermediária antes da via C2, como pode ser observado com a presença da espécie *H. isocalycia*, onde ocorre uma diminuição gradual entre a quantidade de GDC das C3 para a proto-Kranz (FIGURA 13-C; TABELA 5, ANEXO). Esse estágio entre as vias C3 e C4 é essencial, uma vez que essa perda abrupta de GDC nas células do mesofilo seria fatal para o vegetal, pois nesses estágios a célula da bainha ainda não tem capacidade suficiente para descarboxilar todo o volume de glicina produzido (SCHULZE et al., 2013; SCHULZE; WESTHOFF; GOWIK, 2016). Assim, espécies proto-Kranz facilitariam o estágio subsequente C2, em que toda a glicina deve se movimentar da célula do mesofilo para a da bainha onde é descarboxilada (MUHAIDAT et al., 2011; SAGE et al., 2013).

Em plantas C2, o transporte de glicina para as células da bainha cria altas concentrações de CO<sub>2</sub>, possibilitando uma pressão para o aumento do número de cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos nessas células (SCHULZE; WESTHOFF; GOWIK, 2016) e permitindo a Rubisco estar mais

engajada na fixação de CO<sub>2</sub> (SCHULZE et al., 2013). Esse movimento cria um mecanismo concentrador de carbono análogo ao que é descrito para as plantas C<sub>4</sub>, com a diferença de que ao invés de ácidos de quatro carbonos o movimento ocorre via caso moléculas de dois carbonos (RAWSTHORNE et al., 1988; SAGE; STATA, 2015; SCHULZE et al., 2013). Apesar da especificidade de GDC por células BFV, a Rubisco continua sendo expressada em ambas as células (FIGURA 11-G e H, ANEXO). Enquanto existe expressão da Rubisco no mesofilo, alta expressão de genes responsáveis por enzimas envolvidas na atividade fotorrespiratória é requerida (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016).

Acredita-se que a via C<sub>2</sub> evoluiu anteriormente à C<sub>4</sub> (VOGAN; FROHLICH; SAGE, 2007), sendo o estabelecimento de características de anatomia Kranz facilitadoras para a inicialização da regulação positiva para o metabolismo C<sub>4</sub> (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Esse conjunto de modificações leva à redução do  $\Gamma$  (MONSON; RAWSTHORNE, 2000; VON CAEMMERER, 2000), como já descrito anteriormente para *H. aturensis* (TABELA 2). Essas espécies C<sub>2</sub> possuem densidade de plasmodesmas na interface entre as células do mesofilo e da bainha, entre o que é encontrado para C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, sendo isso necessário para facilitar a troca de metabólitos entre esses dois tipos de células (MONSON; RAWSTHORNE, 2000). Apesar de não ter sido feita quantificação para esse tipo de estrutura, a posição das enzimas e a diminuição significativa do  $\Gamma$  em *H. aturensis* deve indicar que há uma facilidade em movimento de metabólitos entre as células M e BFV em relação à sua proto-Kranz relacionada *H. iscalyica*.

Para compensar o maior investimento relativo às modificações estruturais presentes nas intermediárias, como na arquitetura dos feixes vasculares, os ganhos fotossintéticos deveriam ser maiores que os gastos (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016). Entretanto, os maiores valores de  $A$  para *H. aturensis* ocorre apenas em concentrações de CO<sub>2</sub> reduzidas, sendo comparáveis

aos valores da C3 na medida em que a concentração de CO<sub>2</sub> aumenta (FIGURA 17). Para plantas C2 o aumento fotossintético é vantajoso em condições de baixas concentrações de CO<sub>2</sub> que remete a condições encontradas em épocas do passado geológico (VOGAN; FROHLICH; SAGE, 2007), porém no contexto atual de aumento do CO<sub>2</sub> na atmosfera, o mecanismo concentrador não parece ter muitas vantagens (KORRES et al., 2016). Além disso, plantas intermediárias também não possuem maior eficiência do uso do nitrogênio em relação às C3 (VOGAN; SAGE, 2011).

No clado estudado, o estabelecimento do ciclo C2 ocorreu pelo menos duas vezes, com as espécies *H. aturensis* e *H. longispicula*. A existência de plantas intermediárias não significam pontos finais de evolução, mas uma etapa para o surgimento C4 desde que a condição do ambiente persista (EDWARDS, 2014; HECKMANN et al., 2013). A espécie *H. aturensis* ocupa um nicho ecológico que a diferencia do centro de ocorrência da *H. longispicula* (FIGURA 5). Enquanto *H. aturensis* está mais relacionada com locais de elevadas médias de temperatura, para *H. longispicula* a quantidade de água disponível é o fator limitante (FIGURA 4). Tanto em condições de altas temperaturas quanto de limitação hídrica a refixação de CO<sub>2</sub> liberado pela glicina se mostra vantajosa por diminuir as taxas fotorrespiratórias.

A partir dos dados obtidos, não se pode determinar o tipo fotossintético da *H. longispicula*, apesar de saber que ela é uma C2. Essa espécie é candidata à C2- Tipo II ou C4-like. Caso haja atividade C4 nessa espécie, como explicado anteriormente por conta dos valores de isótopos (TABELA 1), é possível que essa intermediária represente uma etapa ainda mais próxima da C4 na evolução entre as duas vias, a diferenciando de *H. aturensis*, onde etapas C4 são improváveis. Algumas intermediárias desenvolvem o transporte fotorrespiratório, porém nunca utilizam a via C4 para balancear o nitrogênio, enquanto em casos onde etapas C4 já estão presentes, o rebalço de nitrogênio

é realizado pela transferência de compostos envolvidos nessa via (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016).

Espécies intermediárias são capazes de trazer linhagens para ocupar nichos ecológicos mais quentes que por promoverem a fotorrespiração, podem favorecer o surgimento da via C4 (LUNDGREN; CHRISTIN, 2016). Nas espécies do gênero *Blepharis*, as intermediárias compartilham o mesmo espaço climático que favorece o surgimento de espécies C4, sendo essa localidade quente e árida (FISHER et al., 2015), como o que é geralmente esperado para a evolução da via fotossintética de C4 (SAGE; SAGE; KOCACINAR, 2012). Entretanto, plantas C4 tendem a se diversificar por uma faixa ambiental maior do que as não-C4 que tendem a permanecer confinadas a determinadas condições ambientais às quais estão mais adaptadas (CHRISTIN; OSBORNE, 2014; LUNDGREN et al., 2015). Esse comportamento pode ser visualizado para as espécies estudadas em que as espécies do gênero C4 *Mesosetum* ocupam uma ampla faixa de ambientes (FIGURA 5; 4, ANEXO). Dessa maneira, as diferenças entre nichos ecológicos, além das prováveis diferenças metabólicas entre as intermediárias levanta a questão de qual o papel de cada uma dessas intermediárias no surgimento da via C4 nesse grupo.

Para as C4 pode-se perceber a divisão espacial entre as enzimas Rubisco e PEPc, além das organelas e GDC envolvidas na fotorrespiração estarem preferencialmente nas células M (FIGURAS 14-C e D; 12, ANEXO). A ausência de Rubisco, na célula do mesofilo na evolução C4, é considerada uma modificação relativa a estágios tardios da evolução (PEISKER, 1986). Porém, quando a perda de Rubisco na célula do mesofilo é completa, pode-se proceder a evolução da via C4 que vem acompanhada da diminuição da expressão das enzimas fotorrespiratórias (BRÄUTIGAM; GOWIK, 2016), sendo a maior parte da expressão destas relacionadas com as células da bainha (DÖRING et al., 2016).

A evolução C4 se inicia com a modificação do metabolismo fotorrespiratório para as células da bainha e é finalizado pelas modificações relativas ao estabelecimento do ciclo C4 e à otimização das enzimas relacionadas a ele (HECKMANN et al., 2013). Essas etapas podem ser observadas nas espécies pertencentes ao clado *Homolpeis/Mesosetum*, fazendo desse um candidato a modelo anatômico e bioquímico de evolução da via C4 em poáceas. Logicamente a existência de duas espécies C2 que possuem diferenças, pelo menos no que diz respeito à ocorrência ambiental deixa clara a necessidade de entender, por meio da produção de uma filogenia robusta, o papel dessas duas espécies no aparecimento da via C4 no gênero irmão *Mesosetum*.

## 6 CONCLUSÃO

Os padrões de distribuição ambiental em conjunto com os caracteres anatômicos, ultraestruturais e enzimáticos permitem afirmar que as espécies da subtribo *Arthropogoninae* possuem adaptações que tornam possível o surgimento de fotossíntese C4 nesse grupo. A confirmação de duas espécies intermediárias *H. isocalycia* (C3- proto-Kranz) e *H. aturensis* (C2) faz do clado *Homolepis/Mesosetum* um modelo anatômico e bioquímico de evolução C4 em poáceas. Todas as principais etapas evolutivas são encontradas, como a redução da distância entre feixes vasculares, utilização do CO<sub>2</sub> fotorrespiratório, metabolismo da glicina confinado na célula BFV e estabelecimento completo do ciclo C4. Uma terceira espécie, a *H. longispicula* também pode ser considerada uma candidata à intermediária entre as duas vias, entretanto mais detalhamento para confirmar seu tipo fotossintético é necessário. Uma vez que etapas da via C4 já podem estar presentes nas espécies intermediárias, análises das enzimas envolvidas nessa via são necessárias, bem como a produção de uma filogenia que inclua todas as espécies do gênero *Homolepis*. Os resultados gerados, bem como etapas subsequentes desse estudo permitem a geração de conhecimento que pode facilitar a inserção de caracteres C4 em culturas C3, como o caso do arroz, em um futuro próximo.





## REFERÊNCIAS

- ALONSO-CANTABRANA, H.; VON CAEMMERER, S. Carbon isotope discrimination as a diagnostic tool for C4 photosynthesis in C3-C4 intermediate species. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 67, n. 10, p. 3109–3121, May 2016.
- BAUWE, H. Photorespiration: the bridge to C4 photosynthesis. . In: RAGHAVENDRA, A. S., SAGE, R. F., eds. **C4 photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms**. Advances in Photosynthesis and Respiration. 1 ed. Amsterdam: Springer, 2011. cap. 6, p. 81-108.
- BEERLING, D. J.; OSBORNE, C. P. The origin of the savanna biome. **Global Change Biology**, Urbana, v. 12, p. 2023–2031, Nov. 2006.
- BELLASIO, C.; LUNDGREN, M. R. Anatomical constraints to C4 evolution: light harvesting capacity in the bundle sheath. **New Phytologist**, Lancaster, v. 212, n. 2, p. 485-496, Oct. 2016.
- BOND, W. J. What limits trees in C4 grasslands and savannas? **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, New York, v. 39, p. 641-659, Dec. 2008.
- BOND, W. J.; MIDGLEY, G. F. Carbon dioxide and the uneasy interactions of trees and savannah grasses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 367, n. 12, p. 601–612, Feb. 2012.
- BOUCHENAK-KHELLADI, Y. et al. Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Richmond, v. 162, p. 543–557, Apr. 2010.
- BRÄUTIGAN, A.; GOWIK, U. Photorespiration connects C3 and C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 67 n. 10, p. 2953-2962, May 2016.
- BREMOND, L.; BOOM, A.; FAVIER, C. Neotropical C3/C4 grass distributions- present, past and future. **Global Change Biology**, Urbana, v. 18, n. 7, p. 2324-2334, Apr. 2012.
- BRUGNOLI, E.; FARQUHAR, G. D. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S.,

eds. **Photosynthesis: physiology and metabolism**. 1 ed. Amsterdam: Springer, 2000. cap. 17, p. 399–434.

CERLING, T. E. Paleorecords of C4 plants and ecosystems. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K., eds. **C4 plant biology**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 13, p. 445-469.

CERLING, T. E. et al. Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. **Nature**, London, v. 389, p. 153–158, July 1997.

CERLING, T. E.; EHLERINGER, J. R.; HARRIS, J. M. Carbon dioxide starvation, the development of C4 ecosystems, and mammalian evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 353, p. 159–171, Jan. 1998.

CERNUSAK, L. A. et al. Environmental and physiological determinants of carbon isotope discrimination in terrestrial plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 200, n. 4, p. 950-965, Dec. 2013.

CHEN, S. T. et al. E. Regional-scale variability in the spread of grasslands in the late Miocene. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 437, p. 42–52, Nov. 2015.

CHRISTIN, P. A. et al. Anatomical enablers and the evolution of C4 photosynthesis in grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, San Diego, v. 110, n. 4, p. 1381-1386, Jan. 2013a.

CHRISTIN, P. A. et al. C4 eudicots are not younger than C4 monocots. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 9, p. 3171–3181, Mar. 2011.

CHRISTIN, P. A. et al. Evolution of C4 Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Grasses, from Genotype to Phenotype. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 357-365, Dec. 2009.

CHRISTIN, P. A. et al. Genetic Enablers Underlying the Clustered Evolutionary Origins of C4 Photosynthesis in Angiosperms. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 846-858, Jan. 2015.

CHRISTIN, P. A. et al. Multiple photosynthetic transitions, polyploidy, and lateral transfer in the grass subtribe Neurachninae. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, n. 17, p. 6297-6308, Oct. 2012.

- CHRISTIN, P. A. et al. Oligocene CO<sub>2</sub> decline promoted C4 photosynthesis in grasses. **Current Biology**, Cambridge, USA, v. 18, p. 37-43, Jan. 2008.
- CHRISTIN, P. A. et al. Parallel recruitment of multiple genes into C4 photosynthesis. **Genome Biology and Evolution**, Düsseldorf, v. 5, n. 11, 2174-2187, Oct. 2013b.
- CHRISTIN, P. A.; FRECKLETON, R. F.; OSBORNE, C. P. Can phylogenetics identify C4 origins and reversals? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 25, n. 7, p. 403-409, July 2010.
- CHRISTIN, P. A.; OSBORNE, C. P. The evolutionary ecology of C4 plants. **New Phytologist**, Lancaster, v. 204, p. 765-781, Dec. 2014.
- CHRISTIN, P. A.; OSBORNE, C. P. The recurrent assembly of C4 photosynthesis, an evolutionary tale. **Photosynthesis Research**, Baton Rouge, v. 117, p. 163-175, Nov. 2013.
- CONNOLLY-BOUTIN, L.; SMIT, B. Climate change, food security, and livelihoods in sub-Saharan Africa. **Regional Environmental Change**, Montreal, v. 16, n. 2, p. 385-399, Feb. 2016.
- COTTON, J. M.; HYLAND, E. G.; SHELDON, N. D. Multi-proxy evidence for tectonic control on the expansion of C4 grasses in northwest Argentina. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 395, p. 41–50, June 2014.
- COUSINS, A. B.; BADGER, M. R.; VON CAEMMERER, S. C4 photosynthetic isotope exchange in NAD-ME- and NADP-ME-type grasses. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 1695–1703, Mar. 2008.
- DAI, Z. Y.; KU, M. S. B.; EDWARDS, G. E. Oxygen sensitivity of photosynthesis and photorespiration in different photosynthetic types in the genus *Flaveria*. **Planta**, Bonn, v. 198, n. 4, p. 563–571, Apr. 1996.
- DENGLER, N. G. et al. Quantitative Leaf Anatomy of C3 and C4 Grasses (Poaceae): Bundle Sheath and Mesophyll Surface Area Relationships. **Annals of Botany**, Oxford, v. 73, n. 3, p. 241-255, Mar. 1994.
- DENGLER, N. G.; DENGLER, R. E.; HATTERSLEY, P. W. Differing Ontogenetic Origins of PCR ("Kranz") Sheaths in Leaf Blades of C4 Grasses

(Poaceae). **American Journal of Botany**, Storrs, v. 72, n. 2, p. 284-302, Feb. 1985.

DÖRING, F. et al. Most photorespiratory genes are preferentially expressed in the bundle sheath cells of C4 grasses *Sorghum bicolor*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 67, n. 10, p. 3053-3064, May 2016.

EDWARDS, E. J. et al. The origins of C4 grasslands: Integrating evolutionary and ecosystem science. **Science**, Washington, v.328, p. 587-591, Apr. 2010.

EDWARDS, E. J. Plant Evolution: The inevitability of C4 photosynthesis. **eLife**, Cambridge, UK, v. 3, p. 1-4, July 2014.

EDWARDS, E. J.; SMITH S. A. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C4 grasses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, San Diego, v. 107, n. 6, p. 2532-2537, Feb. 2010.

EDWARDS, E. J.; STILL, C. J. Climate, phylogeny and the ecological distribution of C4 grasses. **Ecology Letters**, Oxford, v. 11, p. 266-276, Mar. 2008.

EDWARDS, G. E. et al. What does it take to be C4? Lessons from the evolution of C4 photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 46-49, Jan. 2001.

EDWARDS, G. E.; KU, M. S. B.; HATCH, M. D. Photosynthesis in *Panicum milioides*, a species with reduced photorespiration. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1185- 1195, Oct. 1982.

EDWARDS, G. E.; VOZNESENSKAYA, E. V. C4 photosynthesis: Kranz forms and single-cell C4 in terrestrial plants. In: RAGHAVENDRA, A. S., SAGE, R. F., eds. **C4 photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms**: Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer, 2011. v. 32. 29–61.

EHLERINGER, J. R.; CERLING, T. E.; HELLIKER, B. R. C4 photosynthesis, atmospheric CO<sub>2</sub>, and climate. **Oecologia**, Berlin, v. 112, n. 3, p. 285–299, Oct. 1997.

EVANS, J. R. et al. Resistances along the CO<sub>2</sub> diffusion pathway inside leaves. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 60, n. 8, p. 2235-2248, Apr. 2009.

FARQUHAR, G. D. 1983. On the Nature of carbon isotope discrimination in C<sub>4</sub> species. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 10, p. 205–226, Jan. 1983.

FISHER, A. E. et al. Evolutionary history of *Blepharis* (Acanthaceae) and the origin of C<sub>4</sub> photosynthesis in section *Acanthodium*. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 176, n. 8, p. 770–790, Oct. 2015.

FLANNIGAN, M. D. et al. Fuel moisture sensitivity to temperature and precipitation: climate change implications. **Climatic Change**, Princeton, v. 134, n. 1, p. 59–71, Jan. 2016.

FRANKS, P. J. et al. Sensitivity of plants to changing atmospheric CO<sub>2</sub> concentration: from the geological past to the next century. **New Phytologist**, Lancaster, v. 197, n. 4, p. 1077–1094, Mar. 2013.

FURBANK, R. T. Evolution of the C<sub>4</sub> photosynthetic mechanism: are there really three C<sub>4</sub> acid decarboxylation types? **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 9, p. 3103–3108, Apr. 2011.

GARCIA, R. J. F. et al. A contribution to the phytogeography of Brazilian campos: an analysis based on Poaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 703–713, Out./Dez. 2009.

GILLON, J. S.; GRIFFITHS, H. The influence of (photo)respiration on carbon isotope discrimination in plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 20, n. 10, p. 1217–1230, Oct. 1997.

GIUSSANI, L. M. et al. A molecular phylogeny of the grass subfamily Panicoideae (Poaceae) shows multiple origins of C<sub>4</sub> photosynthesis. **American Journal of Botany**, Storrs, v. 88, n. 11, p. 1993–2012, Nov. 2001.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The path from C<sub>3</sub> to C<sub>4</sub> photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 1, p. 56–63, Oct. 2011.

GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP II (GPWG II). New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C<sub>4</sub> origins. **New Phytologist**, Lancaster, v. 193, n. 2, p. 304–312, Jan. 2012.

GRIFFITHS, H. et al. You're so vein: bundle sheath physiology, phylogeny and evolution in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 36, n. 2, p. 249–261, Feb. 2013.

GROOT, W. J.; WARDATI; WNAG, Y. Calibrating the fine fuel moisture code for grass ignition potential in Sumatra, Indonesia. **International Journal of Wildland Fire**, Clayton South, v. 14, n. 2, p. 161-168, 2005.

HATAKEYAMA, Y; UENO; O. Intracellular position of mitochondria and chloroplasts in bundle sheath and mesophyll cells of C3 grasses in relation to photorespiratory CO<sub>2</sub> loss. **Plant Production Science**, Nagoya, v. 19, n. 4, p. 540-551, Aug. 2016.

HATTERSLEY, P. W.; BROWNING, A. J. Occurrence of the suberized lamella in leaves of grasses of different photosynthetic types. I. In parenchymatous bundle sheaths and PCR ('Kranz') sheaths. **Protoplasma**, Vienna, v. 109, p. 371-401, July 1981.

HATTERSLEY, P. W.; WATSON, L. C4 Grasses: an Anatomical Criterion for Distinguishing between NADP-Malic Enzyme Species and PCK or NAD-Malic Enzyme Species. **Australian Journal of Botany**, Darwin, v. 24, p. 297-308, 1976.

HECKATHORN, S. A. et al. C4 plants and herbivory. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K., eds. **C4 plant biology**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 9, p. 258-312.

HECKMANN, D. et al. Predicting C4 photosynthesis evolution: modular, individually adaptive steps on a Mount Fuji fitness landscape. **Cell**, Cambridge, USA, v. 153, n. 7, p. 1579-1588, June 2013.

HENDERSON, S. A.; VON CAEMMERER, S.; FARQUHAR, G. D. Short-term measurements of carbon isotope discrimination in several C4 species. **Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 19, n. 3, p. 263-285, Jan. 1992.

HOETZEL, S. et al. The role of fire in Miocene to Pliocene C4 grassland and ecosystem evolution. **Nature Geoscience**, London, v. 6, p. 1027-1030, Oct. 2013.

HUANG, Y. et al. Climate change as the dominant control on glacial-interglacial variations in C3 and C4 plant abundance. **Science**, Washington, v. 293, p. 1647-1651, Aug. 2001.

JACOBS, B. F.; KINGSTON, J. D.; JACOBS, L. L. The origin of grass dominated ecosystems. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 86, n. 2, p. 590–643, 1999.

JONES, S. S.; BURKE, S. V.; DUVALL, M. R. Phylogenomics, molecular evolution, and estimated ages of lineages from the deep phylogeny of Poaceae. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 300, n. 6, p. 1421-1436, Jan. 2014.

KEELEY, J. E.; RUNDEL, P. W. Evolution of CAM and C4 carbon-concentrating mechanisms. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 164, p. 55–77, May 2003.

KEELEY, J. E.; RUNDEL, P. W. Fire and the Miocene expansion of C4 grasslands. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 683-690, Apr. 2005.

KEERBERG, O. et al. C2 photosynthesis generates about 3-fold elevated leaf CO<sub>2</sub> levels in the C3–C4 intermediate species *Flaveria pubescens*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 13, p. 3649–3656, July 2014.

KHOSHRAVESH, R. et al. C3-C4 intermediacy in grasses: organelle enrichment and distribution, glycine decarboxylase expression, and the rise of C2 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 67, n. 10, p. 3065-3078, May 2016.

KIM, D. et al. Terrestrial biome distribution in the Late Neogene inferred from a black carbon record in the northeastern equatorial Pacific. **Nature**, London, v. 8, p. 1-8, Sept. 2016.

KORRES, N. E. et al. Cultivars to face climate change effects on crops and weeds: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 36, n. 12, Feb. 2016.

KÜLAHOGLU, C. et al. Comparative transcriptome atlases reveal altered gene expression modules between two Cleomaceae C3 and C4 plant species. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 26, n. 8, p. 3243-3260, Aug. 2014.

LANGDALE, J. A. C4 cycles: Past, Present, and Futures research on C4 photosynthesis. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 23, n. 11, p. 3879-3892, Nov. 2011.



LATORRE, C.; QUADE, J.; MCINTOSH, W. The expansion of C4 grasses and global change in the late Miocene: stable isotope evidence from the Americas. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 146, n. 1-2, p. 83–96, Jan. 1997.

LE ROUX, J. P. A review of Tertiary climate changes in southern South America and the Antarctic Peninsula. Part 2: continental conditions. **Sedimentary Geology**, Amsterdam, v. 247-248, p. 21-38, Mar. 2012.

LEEGOOD, R. C.; VON CAEMMERER, S. Regulation of photosynthetic carbon assimilation in leaves of C3–C4 intermediate species of *Moricandia* and *Flaveria*. **Planta**, Bonn, v. 192, n. 2, p. 232–238, Jan. 1994.

LIU, H.; OSBORNE, C. P. Water relations traits of C4 grasses depend on phylogenetic lineage, photosynthetic pathway, and habitat water availability. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 66, n. 3, p. 761-773, Feb. 2015.

LUNDGREN, M. R. et al. Photosynthetic innovation broadens the niche within a single species. **Ecology Letters**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1021-1029, Oct. 2015.

LUNDGREN, M. R.; CHRISTIN, P. A. Despite phylogenetic effects, C3-C4 lineages bridge the ecological gap to C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 68, n. 2, p. 241-254, Dec. 2016.

LUNDGREN, M. R. et al. Evolutionary implications of C3–C4 intermediates in the grass *Alloteropsis semialata*. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 39, n. 9, p. 1874-1885, Sept. 2016.

LUNDGREN, M. R.; OSBORNE, C. P.; CHRISTIN, P. A. Deconstructing Kranz anatomy to understand C4 evolution. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 13, p. 3357-3369, May 2014.

LUNT, D. J. et al. Modelling Late Oligocene C4 grasses and climate. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, Amsterdam, v. 251, n. 2, p. 239-253, Aug. 2007.

MACFADDEN, B. J. et al. Ancient latitudinal gradients of C3/C4 grasses interpreted from stable isotopes of New World Pleistocene horse (*Equus*) teeth. **Global Ecology and Biogeography**, Tucson, v. 8, n. 2, p. 137-149, Mar. 1999.

MALLMANN, J. et al. The role of photorespiration during the evolution of C4 photosynthesis in the genus *Flaveria*. **eLife**, Cambridge, v. 3, p. 1-23, June 2014.

MARCH, R. H.; CLARK, L. G. Sun-shade variation bamboo (Poaceae: Bambusoideae) leaves. **Telopea**, v. 13, n 1-2, p. 93-104, 2011.

MCKOWN, A. D.; DENGLER, N. G. Key innovations in the evolution of Kranz anatomy and C4 vein pattern in *Flaveria* (Asteraceae). **American Journal of Botany**, Storrs, v. 94, n. 3, p. 382–399, Mar. 2007.

MERTZ, R. A.; BRUTNELL, T. P. Bundle sheath suberization in grass leaves: multiple barriers to characterization. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 13, p. 3371-3380, Mar. 2014.

MONSON, R. K. et al. Co-function of C3-and C4-photosynthetic pathways in C3, C4 and C3-C4 intermediate *Flaveria* species. **Planta**, Bonn, v. 168, n. 4, p. 493–502, Sept. 1986.

MONSON, R. K. et al. Carbon-isotope discrimination by leaves of *Flaveria* species exhibiting different amounts of C3-and C4-cycle co-function. **Planta**, Bonn, v. 174, n. 2, p. 145–151, May 1988.

MONSON, R.; RAWSTHORNE, S.; CO<sub>2</sub> assimilation in C3–C4 intermediate plants. In: LEEGOOD, R. C.; SHARKEY, T. D.; VON CAEMMERER, S., eds. **Photosynthesis: physiology and metabolism**. 1 ed. Amsterdam: Springer, 2000. cap. 22, p. 533–550.

MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, New York, v. 28, n. 4, p. 333-356, Aug. 2012.

MUHAI DAT, R. et al. Characterization of C3–C4 intermediate species in the genus *Heliotropium* L. (Boraginaceae): anatomy, ultrastructure and enzyme activity. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 34, n. 10, p. 1723-1736, Oct. 2011.

MURPHY, B. P.; BOWMAN, D. M. J. S. Seasonal water availability predicts the relative abundance of C3 and C4 grasses in Australia. **Global Ecology and Biogeography**, Tucson, v. 16, n. 2, p. 160-169, Mar. 2007.

MIYAKE, H. Starch accumulation in the bundle sheaths C3 plants: a pre-condition for C4 photosynthesis. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 890-896, May 2016.

NESTEROV, V. **Combustibility of the Forest and Methods for its Determination**. Moscow: USSR State Industry Press, 1949.

O'LEARY, M. H. Carbon isotope fractionation in plants. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 553–567, Sept. 1981.

OSBORNE, C. P. The geologic history of C4 plants. In: RAGHAVENDRA, A. S., SAGE, R. F., eds. **C4 photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms**. Advances in Photosynthesis and Respiration. 1 ed. Amsterdam: Springer, 2011. cap. 17, p. 339-357.

OSBORNE, C. P.; BEERLING, D. J. Nature's green revolution: the remarkable evolutionary rise of C4 plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 361, p. 173–194, Jan. 2006.

OSBORNE, C. P.; SACK, L. Evolution of C4 plants: a new hypothesis for an interaction of CO<sub>2</sub> and water relations mediated by plant hydraulics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 367, p. 583–600, Feb. 2012.

OSBORNE, C.P. Atmosphere, ecology and evolution: what drove the Miocene expansion of C4 grasslands? **Journal of Ecology**, London, v. 96, n.1, p. 35-45, Jan. 2008.

OSBORNE, C.P.; FRECKLETON, R. P. Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 276, p. 1753–1760, June 2009.

PAGANI, M. et al. Marked decline in atmospheric carbon dioxide concentrations during the Paleogene. **Science**, Washington, v. 309, p. 600-603, July 2005.

PAGANI, M.; FREEMAN, K. H.; ARTHUR, M. A. Late Miocene atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations and the expansion of C4 grasses. **Science**, Washington, v. 285, p. 876–879, Aug. 1999.

PEISKER, M. Models of carbon metabolism in C3–C4 intermediate plants as applied to the evolution of C4 photosynthesis. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 9, n. 8, p. 627–635, Nov. 1986.

RAWSTHORNE, S. C3-C4 intermediate photosynthesis: linking physiology to gene expression. **The Plant Journal**, East Lansing, v. 2, n. 3, p. 267-274, May 1992.

RAWSTHORNE, S. et al. Photorespiratory metabolism and immunogold localization of photorespiratory enzymes in leaves of C3 and C3-C4 intermediate species of *Moricandia*. **Planta**, Bonn, v. 173, n. 3, p. 298-308, Mar. 1988.

REED, J. E.; CHOLLET, R. Immunofluorescent localization of phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase proteins in leaves of C3, C4 and C3-C4 intermediate *Flaveria* species. **Planta**, Bonn, v. 165, n.4, p. 439-445, Sept. 1985.

SAGE, R. F. Environmental and evolutionary preconditions for the origin and diversification of the C4 photosynthesis syndrome. **Plant Biology**, Freiburg, v. 3, n. 3, p.202-213, May 2001.

SAGE, R. F. et al. The taxonomic distribution of C4 photosynthesis in Amaranthaceae Sensu Stricto. **American Journal of Botany**, Storrs, v. 94, n. 12, p. 1992-2003, Dec. 2007.

SAGE, R. F. The Evolution of C4 photosynthesis. **New Phytologist**, Lancaster, v. 161, n. 2, p. 341-370, Feb. 2004.

SAGE, R. F.; CHRISTIN, P. A.; EDWARDS, E. J. The C4 plant lineages of planet Earth. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 9, p. 3155-3169, Mar. 2011.

SAGE, R. F.; KHOSHRAVESH, R.; SAGE, T. L. From proto-Kranz to C4 Kranz: building the bridge to C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 13, p. 3341-3356, July 2014.

SAGE, R. F.; LI, M.; MONSON, R. K.; The taxonomic distribution of C4 photosynthesis. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K., eds. **C4 plant biology**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 16, p. 551-584.

SAGE, R. F.; SAGE, T. L.; KOCACINAR, F. Photorespiration and the evolution of C4 photosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 19-47, Jan. 2012.

SAGE, R. F.; STATA, M. Photosynthetic diversity meets biodiversity: The C4 example. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 172, p. 104-119, Jan. 2015.

SAGE, R. F.; Tracking the evolutionary rise of C4 metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 67, n. 10, p. 2919-2922, May 2016.

SAGE, R. F.; WAY, D. A.; KUBIEN, D. S. Rubisco, Rubisco activase, and global climate change. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, n. 7, p. 1581-1595, Apr. 2008.

SAGE, R. F.; WEDIN, D. A.; LI, M. The biogeography of C4 photosynthesis: patterns and controlling factors. In: SAGE, R. F.; MONSON, R. K., eds. **C4 plant biology**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1999. cap. 10, p. 313-373.

SAGE, R. F.; ZHU, X. G. Exploiting the engine of C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 9, p. 2989–3000, May 2011.

SAGE, T. L. et al. Initial events during the evolution of C4 photosynthesis in C3 species of *Flaveria* (Asteraceae). **Plant Physiology**, Rockville, v. 163, n. 3, p. 1266-1276, Nov. 2013.

SCHEITER, S. et al. Fire and fire-adapted vegetation promoted C4 expansion in the late Miocene. **New Phytologist**, Lancaster, v. 195, n. 3, p. 653–666, Aug. 2012.

SCHULER, M. L.; MANTEGAZZA, O.; WEBER, A. P. M. Engineering C4 photosynthesis into C3 chassis in the synthetic biology age. **The Plant Journal**, East Lansing, v. 87, n. 1, p. 51-65, July 2016.

SCHULZE, S. et al. Evolution of C4 photosynthesis in the genus *Flaveria*: establishment of a photorespiratory CO<sub>2</sub> pump. **The Plant Cell**, Los Angeles, v. 25, n. 7, p. 2522–2535, July 2013.

SCHULZE, S.; WESTHOFF, P.; GOWIK, U. Glycine decarboxylase em C3, C4 and C3-C4 intermediate species. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 21, p. 29-35, June 2016.

SAIGO, M. et al. Plastidial NADP-malic enzymes from grasses: Unraveling the way to the C4 specific isoforms. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 63, p. 39-48, Feb. 2013.

SILVEIRA, F. A. O. et al. Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. **Plant and Soil**, Crawley, v. 403, p. 129-152, June 2016.

SIMON, M. F. et al. Recent assembly of the cerrado, a Neotropical diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Harpenden, v. 106, p. 20359–20364, Dec. 2009.

SOROS, C. L.; DENGLER, N. G. Ontogenetic derivation and cell differentiation tissues of C3 and C4 Cyperaceae. **American Journal of Botany**, Storrs, v. 88, n. 6, p. 992-1005, June 2001.

STATA, M. et al. Mesophyll chloroplast investment in C3, C4 and C2 species of the genus *Flaveria*. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 904- 918, May, 2016.

STATA, M. et al. Mesophyll cells of C4 plants have fewer chloroplasts than those of closely related C3 plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 37, n. 11, p. 2587-2600, Nov. 2014.

STILL, C. J. et al. Global distribution of C3 and C4 vegetation: carbon cycle implications. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 17, n. 1, p. 1- 14, Mar. 2003.

STOCKS, B. J. et al. Major 1992 forest fires in Central and Eastern Siberia: Satellite and fire danger measurements. In: GOLDAMMER, J. G.; FURYAEV, V. V., eds. **Fire in ecosystems of Boreal Eurasia**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. cap. 12, p. 139-150.

STRÖMBERG, C. A. E. Evolution of grasses and grassland ecosystems. **Annual Review of Earth and Planetary Science**, Palo Alto, v. 39, p. 517-544, May 2011.

STRÖMBERG, C. A. E. et al. Decoupling the spread of grasslands from the evolution of grazer-type herbivores in South America. **Nature**, London, v. 4, p. 1-8, Feb. 2013.

TIPPLE, B.J.; PAGANI, M. The early origins of terrestrial C4 photosynthesis. **Annual Review of Earth and Planetary Science**, Palo Alto, v. 35, p. 435–461, May 2007.

VAN WAGNER, C. E. **Development and structure of the Canadian Forest Fire Weather Index System**. Ottawa: Canadian Forestry Service, 1987.

VISSER, V. et al. Environmental factors determining the phylogenetic structure of C4 grass communities. **Journal of Biogeography**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 232–246, Feb. 2012.

VOGAN, P. J.; FROHLICH, M. W.; SAGE, R. F. The functional significance of C3-C4 intermediate traits in *Heliotropium* L. (Boraginaceae): gas exchange perspectives. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 30, n. 10, p. 1337-1345, Oct. 2007.

VOGAN, P. J.; SAGE, R. F. Water-use efficiency and nitrogen-use efficiency of C3-C4 intermediate species of *Flaveria* Juss. (Asteraceae). **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 34, n. 9, p. 1415-1430, Sept. 2011.

VOLOKITINA, A. V. Forest fuel maps. In: GOLDAMMER, J. G.; FURYAEV, V. V., eds. **Fire in ecosystems of Boreal Eurasia**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. cap. 20, p. 239-252.

VON CAEMMERER, S. A model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation and carbon-isotope discrimination in leaves of certain C3–C4 intermediates. **Planta**, Bonn, v. 178, n. 4, p. 463–474, Mar. 1989.

VON CAEMMERER, S. **Biochemical models of leaf photosynthesis**. 1 ed. Melbourne: CSIRO PUBLISHING, 2000.

VON CAEMMERER, S. Carbon isotope discrimination in C3-C4 intermediates. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 15, n. 9, p. 1063–1072, Dec. 1992.

VON CAEMMERER, S. et al. Carbon isotope discrimination as a tool to explore C4 photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 65, n. 13, p. 3459–3470, July 2014.

VON CAEMMERER, S.; HUBICK, K. T. Short-term carbon-isotope discrimination in C3–C4 intermediate species. **Planta**, Bonn, v. 178, n.4, p. 475–481, Mar. 1989.

VON CAEMMERER, S.; QUICK, W. P.; FURBANK, R. T. The development of C4 rice: current progress and future challenges. **Science**, Washington, v. 336, p. 1671-1672, June 2012.

VOZNESENSKAYA, E. V. et al. Physiological, anatomical and biochemical characterisation of photosynthetic types in genus *Cleome* (Cleomaceae).

**Functional Plant Biology**, Melbourne, v. 34, n. 4, p. 247–267, Jan. 2007.

WANG, J. et al. Size and variability of crop productivity both impacted by CO<sub>2</sub> enrichment and warming—A case study of 4 year field experiment in a Chinese paddy. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 221, p. 40–49, Apr. 2016.

WANG, S.; THOLEN, D.; ZHU, X. G.; C4 photosynthesis in C3 rice: a theoretical of biochemical and anatomical factors. **Plant, Cell & Environment**, Logan, v. 40, n. 1, p. 80–94, Jan. 2017.

WEISE, S. E.; WIJIK, K. J.; SHARKEY, T. D. The role of transitory starch in C3, CAM, and C4 metabolism and opportunities for engineering leaf starch accumulation. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 62, n. 9, p. 3109–3118, May 2011.

WU, H. et al. Elevation-induced climate change as a dominant factor causing the late Miocene C4 plant expansion in the Himalayan foreland. **Global Change Biology**, Urbana, v. 20, p. 1461–1472, May 2014.

ZACHOS, J. et al. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. **Science**, Washington, v. 292, p. 686–693, Apr. 2001.

ZHISHENG, A. et al. Multiple expansions of C4 plant biomass in East Asia since 7 Ma coupled with strengthened monsoon circulation. **Geology**, Antigonish, v. 33, n. 9, p. 705–708, Sept. 2005.

ZHOU, B. et al. Late Pliocene-Pleistocene expansion of C4 vegetation in semiarid East Asia linked to increased burning. **Geology**, Antigonish, v. 42, n. 12, p. 1067–1070, Oct. 2014.





**ANEXO A - DADOS E IMAGENS ADICIONAIS PARA AS ESPÉCIES  
DA SUBTRIBO ARTHOPOGONINAE ESTUDADAS**

Tabela 1. Lista das espécies provenientes de material herborizado com suas respectivas informações de coleta. Amostras seguidas de (\*) foram utilizadas para as análises anatômicas.

| Espécies  | Localidade                          | Coletor                   | Data de coleta | Código do Herbário |
|---|-------------------------------------|---------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Apochloa animara</i><br>(Renvoize) Zuloaga & Morrone           | Brasil, Bahia, Água Quente          | Mori et al. 12669         | Jul/1979       | 652006             |
|   | Brasil, Bahia, Mucugê               | Morri; Beston 13627       | Mar/1980       | 652007             |
| <i>Apochloa bahiensis</i><br>(Renvoize) Zuloaga & Morrone         | Brasil, Minas Gerais, Serro         | Hatschbach 50215          | Nov/1985       | 00863797           |
| <i>Apochloa chnoodes</i><br>(Trin.) Zuloaga & Morrone             | —                                   | Huber; Steyermaris 6918   | Jan/1983       | —                  |
|   | —                                   | Boom; Gopaul 7561         | Abr/1987       | —                  |
| <i>Apochloa cipoensis</i><br>(Renvoize & Send.) Zuloaga & Morrone | Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó | Hatschbach 35361 (*)      | Out/1974       | 00863832           |
| <i>Apochloa eligulata</i><br>(N.E. Br.) Zuloaga & Morrone         | Venezuela                           | Huber et al. 10185        | Fev/1985       | —                  |
|   | Venezuela                           | Steyermarck et al. 128933 | Fev/1983       | —                  |
| <i>Apochloa euprepes</i><br>(Renvoize) Zuloaga & Morrone          | Brasil, Bahia, Palmeiras            | Mori 13306                | Fev/1980       | 652138             |
|   | Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó | Irwin et al. 20387        | Fev/1968       | 00863904           |
| <i>Apochloa lorea</i> (Trin.) Zuloaga & Morrone                   | —                                   | Anderson 35227            | Fev/1972       | —                  |

| Espécies  | Localidade                              | Coletor                      | Data de coleta | Código do Herbário |
|---|---|------------------------------|----------------|--------------------|
|   | —                                       | Irwin et al.<br>20296        | Fev/1968       | —                  |
| <i>Apochloa lutzii</i><br>(Swallen) Zuloaga & Morrone                   | Brasil, Rio de Janeiro, Petrópolis      | Martinelli 6151              | Out/1979       | 652719             |
|   | Brasil, Minas Gerais, Serra do Caparaó  | Chase 9724                   | Mai/1925       | 00863459           |
| <i>Apochloa molinioides</i><br>(Trin.) Zuloaga & Morrone                | Brasil, Minas Gerais                    | Irwin et al.<br>22725        | —              | —                  |
|   | Brasil, Minas Gerais                    | Anderson et al.<br>35468 (*) | Fev/1972       | —                  |
| <i>Apochloa poliophylla</i><br>(Renvoize & Zuloaga) Zuloaga & Morrone   | Brasil, Minas Gerais, Caraça            | Emygdio et al.<br>3569       | Jul/1972       | 00864176           |
| <i>Apochloa sipapoensis</i><br>(Swallen) Zuloaga & Morrone              | Venezuela, Amazomas                     | Maguire; Politi<br>27919     | Dez/1945       | 414051             |
| <i>Apochloa steyermarkii</i><br>(Swallen) Zuloaga & Morrone             | Venezuela                               | Steyermark et al.<br>128168  | Jan/1983       | —                  |
|   | —                                       | Steyermark;<br>Wardade 327   | Fev/1955       | —                  |
| <i>Canastra lanceolata</i><br>(Filg.) Morrone, Zuloaga, Davidse & Filg. | Brasil, Minas Gerais, Serra da Canastra | Filgueiras 3591<br>(*)       | Set/1999       | 1009333            |
| <i>Homolepis aturensis</i><br>(Kunth) Chase                             | Costa Rica, Puntarendas                 | Aguilar 13031<br>(*)         | Dez/2010       | —                  |
|   | Belize, Toledo                          | Atha 1238a                   | Ago/1995       | 01087865           |
|   | Peru, Loreto, Coronel Portilho          | Fosberg 28887                | Jun/1947       | 640667             |

| Espécies   | Localidade                               | Coletor                   | Data de coleta | Código do Herbário |
|--|--|---------------------------|----------------|--------------------|
|  | Bolivia, El Beni, Província da Vaca Díez | Solomon 7955              | Jun/1982       | 640668             |
|  | Brasil, Amazonas, Manaus                 | Nee 42378                 | Jan/1992       | 1147061            |
| <i>Homolepis glutinosa</i> (Sw.) Zuloaga & Soderstr.     | Costa Rica, Cartago                      | Pohl 14126                | Ago/1982       | —                  |
|  | —  | Pohl; Pinetle, 13253      | —              | —                  |
|  | Puerto Rico, Munico Chales               | Atha et al. 671 (*)       | Ago/2008       | 0108769            |
|  | Guiana, Região do Rio Mazarani           | Boom; Gopaul 7291         | Abr/1987       | —                  |
| <i>Homolepis isocalycia</i> (G. Mey.) Chase              | —  | Godfrey 2047              | Nov/1965       | —                  |
|  | Guiana, Mabunu Hill                      | Pipoly 8650               | Set/1986       | —                  |
|  | Guiana                                   | Henkel; Williams 1994     | Abr/1993       | —                  |
|  | Suriname                                 | Oldenburguer et al. ON355 | Out/1968       | —                  |
| <i>Homolepis longispicula</i> (Döll) Chase               | Brasil, Distrito Federal, Brasília       | Ratter et al. 3356        | Ago/1976       | 00863452           |
|  | Brasil, Curitiba                         | Renvoize 973              | —              | —                  |
|  | Brazil, Minas Gerais, Serra do Cipó      | Eiten et al. 6754         | Nov/1965       | 00862717           |
| <i>Homolepis villaricensis</i> (Mez) Zuloaga & Soderstr. | Argentina, Misiones                      | Morrone 779               | Fev/1996       | —                  |
|  | Argentina, Misiones                      | Montes 27562              | Mar/1958       | —                  |
|  | Argentina                                | Eichentes 747             | Abr/1945       | —                  |
|  | Argentina, Misiones                      | Zuloaga et al. 5664 (*)   | Mar/1996       | —                  |

| Espécies  | Localidade  | Coletor                   | Data de coleta | Código do Herbário |
|---|---|---------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Oplismenopsis najada</i><br>(Hack. & Arechav.)<br>Parodi | Argentina   | Hicken 94                 | 1910           | —                  |
|   | Argentina,<br>Corrientez  | ArBo et al. 8249<br>(*)   | Dez/1998       | —                  |
| <i>Phanopyrum<br/>gymnocarpon</i> (Elliott)<br>Nash         | Estados Unidos,<br>Arkansas, Nevada                                       | Thomas; Yoina<br>162249   | Ago/1999       | —                  |
|   | Estados Unidos,<br>Carolina do Sul  | Nelson 17836              | Set/1996       | —                  |
|   | Estados Unidos,<br>Louisiana, Clinton                                     | Griffin 67 (*)            | Out/2003       | —                  |
| <i>Achlaena<br/>piptostachya</i> Griseb.                    | Cuba, Província<br>Matanzas   | Ekman 16963               | Ago/1923       | 1362418            |
|   | Cuba, Havana  | León 11526                | Out/1923       | 1362428            |
|   | Cuba, Ilha da<br>Juventude  | Killip 45260 (*)          | Dez/1955       | 1362416            |
| <i>Arthropogon filifolius</i><br>Filg.                      | Brasil, Distrito<br>Federal, Brasília,<br>Reserva<br>Ecológica do<br>IBGE | Filgueiras et al.<br>1184 | Set/1985       | 00861371           |
|   | Brasil, Distrito<br>Federal, Brasília,<br>Reserva<br>Ecológica do<br>IBGE | Filgueiras et al.<br>1222 | Set/1986       | 00861396           |
|   | Brasil, Goiás,<br>Serra dos Pireneus                                      | Filgueiras, 1086          | Jul/1983       | 00861370           |
| <i>Arthropogon villosus</i><br>Ness                         | Brasil, Distrito<br>Federal, Brasília,<br>Reserva<br>Ecológica do<br>IBGE | Mendonça et al.<br>629    | Mai/1986       | 00861426           |
|   | Brasil, Distrito<br>Federal, Brasília,<br>Chapada da<br>Contagem          | Irwin et al. 8309         | Set/1965       | 00861372           |
|   | Brasil, Goiás,<br>Planaltina  | Kral et al. 75720         | Nov/1988       | 00861428           |

| Espécies   | Localidade  | Coletor                   | Data de coleta | Código do Herbário |
|--|---|---------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Arthropogon xerachne</i><br>Ekman                       | Brasil, São Paulo,<br>São José dos<br>Campos                    | Eiten et al. 2867<br>(* ) | Mai/1961       | 884658             |
| <i>Coleataenia anceps</i><br>(Michx.) Soreng               | Estados Unidos,<br>Louisiana                                    | Thomas 138182             | Out/1993       | 1650814            |
|  | Estados Unidos,<br>Maryland,<br>Worcester Co                    | Longbottom<br>20176 (* )  | Ago/2013       | 02147633           |
| <i>Coleataenia caricoides</i><br>(Nees ex Trin.)<br>Soreng | Cuba, Ilha da<br>Juvntude                                       | Britton 14701             | Fev/1916       | 1531006            |
|  | Cuba, Pinar del<br>Río, Los Palacios                            | Ekman 10888               | Abr/1920       | 1531009            |
| <i>Coleataenia longifolia</i><br>(Torr.) Soreng            | Estados Unidos,<br>Maryland,<br>Dorchester Co                   | Longbottom<br>20138       | Ago/2013       | 02200592           |
|  | Estados Unidos,<br>Virginia, Princess<br>Anne Co                | Fernald 4766              | Set/1935       | 1769062            |
| <i>Coleataenia petersonii</i> (Hitc. &<br>Ekman) Soreng    | Cuba, Mendoza   | Ekman 11452               | Jun/1920       | 1604850            |
| <i>Coleataenia stenodes</i><br>(Griseb.) Soreng            | República<br>Dominicana,<br>Distrito Nacional,<br>Sierra Pietra | Liogier 24083             | Out/1975       | 1531012            |
|  | Jamaica,<br>Clarendon Parish                                    | Harris 12227              | Nov/1915       | 1531015            |
| <i>Coleataenia tenera</i><br>(Beyr. ex Trin.)<br>Soreng    | Bahamas, Andros   | Correll 49654             | Mai/1978       | 1531033            |
|  | Bahamas, Cat<br>Island  | Correll 46109             | Nov/1975       | 01531031           |
| <i>Mesosetum alatum</i><br>Filg.                           | Brasil, Mato<br>Grosso  | Irwin et al.<br>16467     | Jun/1966       | 00863263           |

| Espécies  | Localidade   | Coletor                     | Data de coleta | Código do Herbário |
|---|--|-----------------------------|----------------|--------------------|
| <i>Mesosetum annuum</i><br>Swallen                          | Brasil, Goiás,<br>Alto Paraíso de<br>Goiás         | Irwin et al.<br>21697       | Mar/1968       | 00863289           |
| <i>Mesosetum arenarium</i><br>Swallen                       | Brazil, Goiás,<br>Serra dos Cristais               | Irwin et al.<br>13337       | Mar/1966       | 00863264           |
|   | Brazil, Minas<br>Gerais, Serra de<br>Santo Antônio | Filgueiras;<br>Burman, 1106 | Jan/1984       | 00863290           |
| <i>Mesosetum blakei</i><br>Swallen                          | Belize   | Gentle 8299                 | Ago/1954       | —                  |
| <i>Mesosetum</i><br><i>cayennense</i> Steud.                | Brasil, Pará                                       | Strudwice et al.<br>4381    | Ago/1981       | 1166196            |
|   | Brasil, Pará                                       | Plowman et al.<br>8696      | Fev/1980       | 1166198            |
|   | Brasil, Goiás,<br>Silvânia                         | Anderson 7135               | Mar/1974       | 00863260           |
| <i>Mesosetum chaseae</i><br>Luces                           | Brasil, Roraima                                    | Coradin;<br>Cordeiro 871    | Out/1977       | —                  |
|   | Guyana   | Peterson et al.<br>7564     | Jun/1989       | —                  |
| <i>Mesosetum</i><br><i>chlorostachyum</i> (Döll)<br>Chase   | Venezuela  | Davidse et al.<br>1683      | Abr/1979       | —                  |
|   | Brazil, Amazonas                                   | de Paula 10421              | Mar/1969       | —                  |
| <i>Mesosetum comatum</i><br>Swallen                         | Argentina,<br>Misiones                             | Morrone et al.<br>1000      | Fev/1996       | —                  |
|   | Argentina,<br>Misiones                             | Zuloaga et al.<br>5329      | Mar/1995       | —                  |
| <i>Mesosetum</i><br><i>elytrochaetum</i> (Hack.)<br>Swallen | Brasil, Goiás                                      | Irwin et al.<br>12700       | Fev/1966       | 00863287           |
|   | Brasil, Goiás                                      | Irwin et al.<br>32768       | Mar/1971       | 00863288           |
| <i>Mesosetum exaratum</i><br>(Trin.) Chase                  | Brasil, Minas<br>Gerais,<br>Jaboticatubas          | Sendulsky 443               | Dez/1971       | 00932902           |
| <i>Mesosetum</i><br><i>ferrugineum</i> (Trin.)              | Brasil, Bahia,<br>Abaíra                           | Ganeu 2684                  | Dez/1993       | 884686             |

| Espécies  | Localidade                       | Coletor                | Data de coleta | Código do Herbário |
|---|----------------------------------|------------------------|----------------|--------------------|
| Chase   | Brasil, Bahia, Abaíra            | Harley et al. 50756    | Jan/1992       | 884684             |
|   | Brasil, Distrito Federal         | Irwin et al. 10660     | Nov/1965       | 00863280           |
| <i>Mesosetum filifolium</i><br>F.T. Hubb.                   | Belize, Distrito de Toledo       | Atha 1218              | Ago/1995       | 229636             |
|   | Nicaragua, Zelaga                | Neil 4417              | Jun/1978       | —                  |
|   | Venezuela                        | Davidse 17417          | Mai/1979       | —                  |
| <i>Mesosetum gibbosum</i><br>Renvoize & Filg.               | Brasil, Bahia, Palmeiras         | Souza et al. 5238      | Fev/1994       | 651148             |
|   | Brasil, Bahia, Abaíra            | Pirani e al. 51473     | Fev/1992       | 884682             |
| <i>Mesosetum loliiforme</i><br>(Hochst. ex Steud.)<br>Chase | Cuba, Pinor del Rio              | Ekman 11350            | Jun/1920       | 651147             |
|   | Cuba, Pinor del Rio              | Ekman 1028             | Jul/1921       | 1604082            |
|   | Brasil, São Paulo                | Sasaki; Sasaki 922     | Jun/2004       | 1018480            |
|   | Brasil, Bahia, Serra do Tombador | Irwin et al. 32477     | Fev/1971       | 651143             |
|   | Brasil, Bahia, Umburana          | Queiroz et al. 5214    | Abr/1999       | 778427             |
|   | Brasil, Bahia, Barreiras         | Davidse et al. 12108   | Abr/1976       | 651150             |
| <i>Mesosetum pappophorum</i> (Nees)<br>Kuhlman.             | Brasil, Brasília                 | Luetzelberg 27072      | Abr/1936       | 00863103           |
|   | Brasil, Ceará                    | Swallen 4615           | Mai/1934       | 00863102           |
|   | Brasil, Ceará                    | Swallen 4453           | Mai/1934       | 00863075           |
| <i>Mesosetum pittieri</i><br>Hitchc.                        | Panamá                           | Allen 839              | Set/1938       | —                  |
| <i>Mesosetum rottboellioides</i>                            | Venezuela, Amazonia              | Hubert e Tilletl, 5398 | Jul/1980       | —                  |

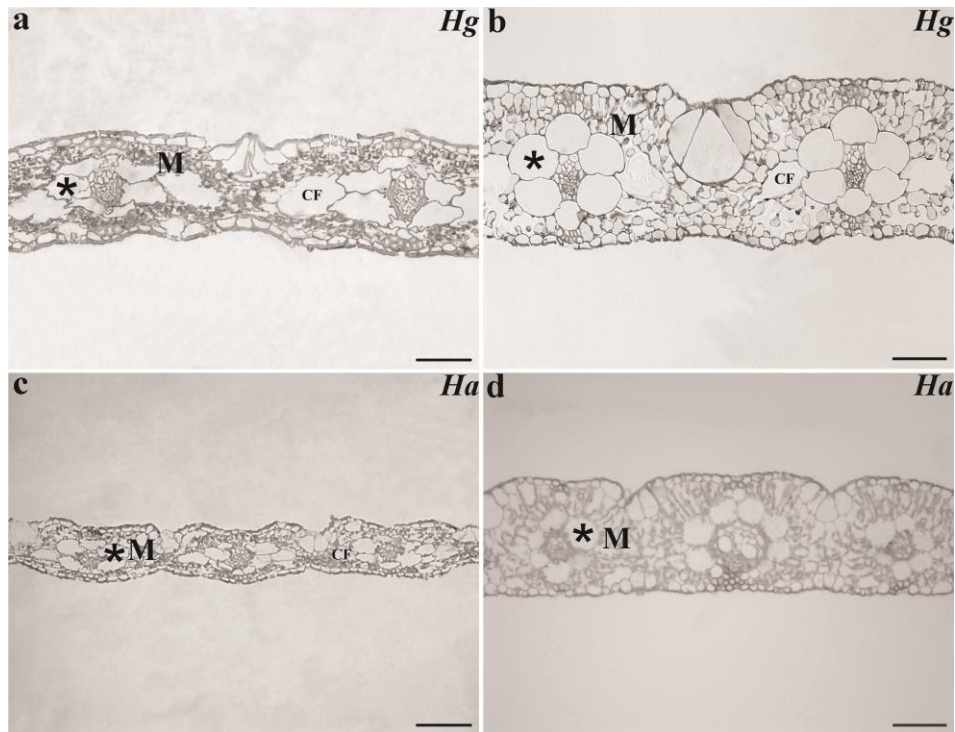


| Espécies   | Localidade                                | Coletor                | Data de coleta | Código do Herbário |
|--|---|------------------------|----------------|--------------------|
| (Kunth) Hitchc.  | Venezuela, Amazonia                       | Huber 5259             | Jun/1980       | —                  |
|  | Venezuela, Amazonia                       | Davidse 2737           | Out/1971       | —                  |
|  | Venezuela, Aturas                         | Davidse e Huber. 15015 | Abr/1978       | —                  |
| <i>Mesosetum wrightii</i> Hitchc.                                | Cuba, Pinor del Rio                       | Ekman 990              | Out/1923       | 1604108            |
|  | Cuba, Villa Clara                         | BroLeon 6430           | Jul/1916       | 1604101            |
| <i>Oncorachis macrantha</i> (Trin.) Morrone & Zuloaga            | Brasil, Distrito Federal, Brasília        | Irwin 8658 (*)         | Set/1965       | 00906148           |
|  | Brasil, Goiás, Serra do Caiapó            | Irwin 7131             | Out/1964       | 00906149           |
|  | Brasil, Minas Gerais, Lagoa Santa         | Warming s.n.           | —              | 00906146           |
| <i>Oncorachis ramosa</i> (Zuloaga & Soderstr.) Morrone & Zuloaga | Brasil, Minas Gerais, Montezuma           | Souza 5474 (*)         | Mar/1994       | 00906125           |
|  | Brasil, Bahia, Abaíra, Gerais do Pastinho | Stannard H51671        | Fev/1992       | 786876             |
|  | Brasil, Bahia                             | Harley 16876           | Mar/1974       | 786874             |
| <i>Tatianyx arnacites</i> (Trin.) Morrone & Zuloaga              | Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó       | Zuloaga 4691           | Fev/1993       | 786915             |
|  | Brasil, Bahia, Abaíra                     | Queiroz H51087         | Fev/1992       | 786909             |
|  | Brasil, Bahia, Rio de Contas              | Carvalho 6446 (*)      | Dez/1997       | 786907             |

Tabela 2. Localidades de coleta das espécies utilizadas para análises de anatomia, ultraestrutura, imunomarcção e trocas gasosas.

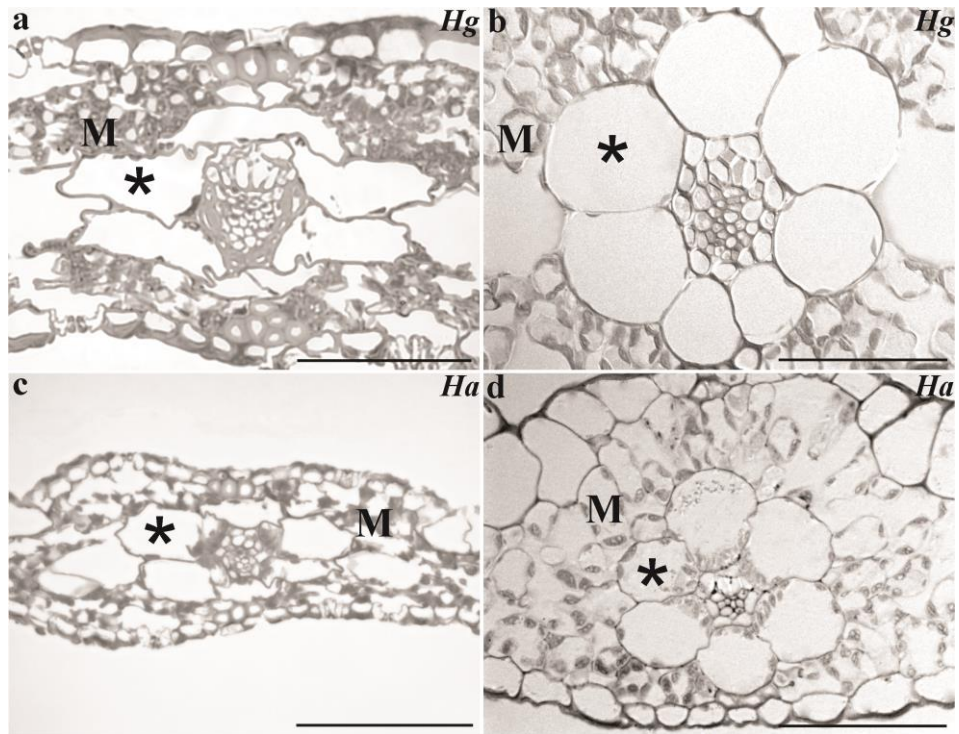
| Espécies                      | Localidade da Coleta                                   | Coordenadas Geográficas      |
|-------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Apochloa euprepes</i>      | Brasil, Minas Gerais, Santana do Riacho, Serra do Cipó | 19°28'67.9"S<br>43°58'96.9"O |
| <i>Apochloa poliophylla</i>   | Brasil, Minas Gerais, Santana do Riacho, Serra do Cipó | 19°28'67.9"S<br>43°58'96.9"O |
| <i>Homolepis glutinosa</i>    | Brasil, Minas Gerais, Nova Lima                        | 20°00'06.9"S<br>43°56'47.6"O |
| <i>Homolepis isocalycia</i>   | Brasil, Minas Gerais, Santana do Riacho, Serra do Cipó | 19°03'18.0"S<br>43°16'55.5"O |
| <i>Homolepis aturensis</i>    | Costa Rica, Limón, Puerto Viejo de Talamanca           | 9°39'27.4"N<br>82°45'08.0"O  |
| <i>Homolepis longispicula</i> | Brasil, Minas Gerais, Santana do Riacho, Serra do Cipó | 19°28'67.9"S<br>43°58'96.9"O |
| <i>Mesosetum ferrugineum</i>  | Brasil, Minas Gerais, Jaboticatubas                    | 19°18'10.0"S<br>43°31'19.0"O |
| <i>Mesosetum loliiforme</i>   | Brasil, Minas Gerais, Santana do Riacho, Serra do Cipó | 19°28'67.9"S<br>43°58'96.9"O |

Figura 1. Comparação de secções foliares transversais entre material herborizado reidratado (a, c) e fixados a partir das plantas cultivadas (b, d) para as espécies *Homolepis glutinosa* (Hg- a, b) e *Homolepis aturensis* (Ha- c, d). M, mesofilo; asteriscos, bainha do feixe vascular; CF, células fusóides. Barras= 50 µm



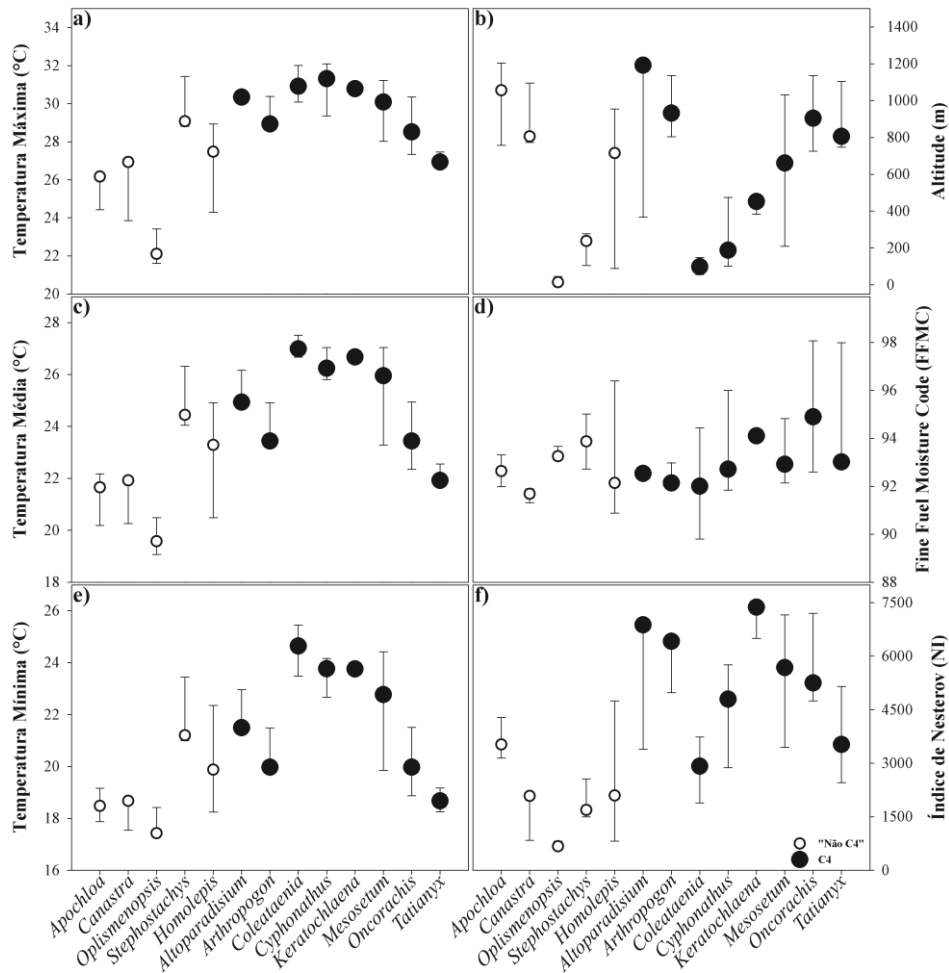
Fonte: Do autor (2017)

Figura 2. Comparação de secções foliares transversais entre material herborizado reidratado (a, c) e fixados a partir das plantas cultivadas (b, d) para as espécies *Homolepis glutinosa* (Hg- a, b) e *Homolepis aturensis* (Ha- c, d). M, mesofilo; asteriscos, bainha do feixe vascular. Barras= 50 µm



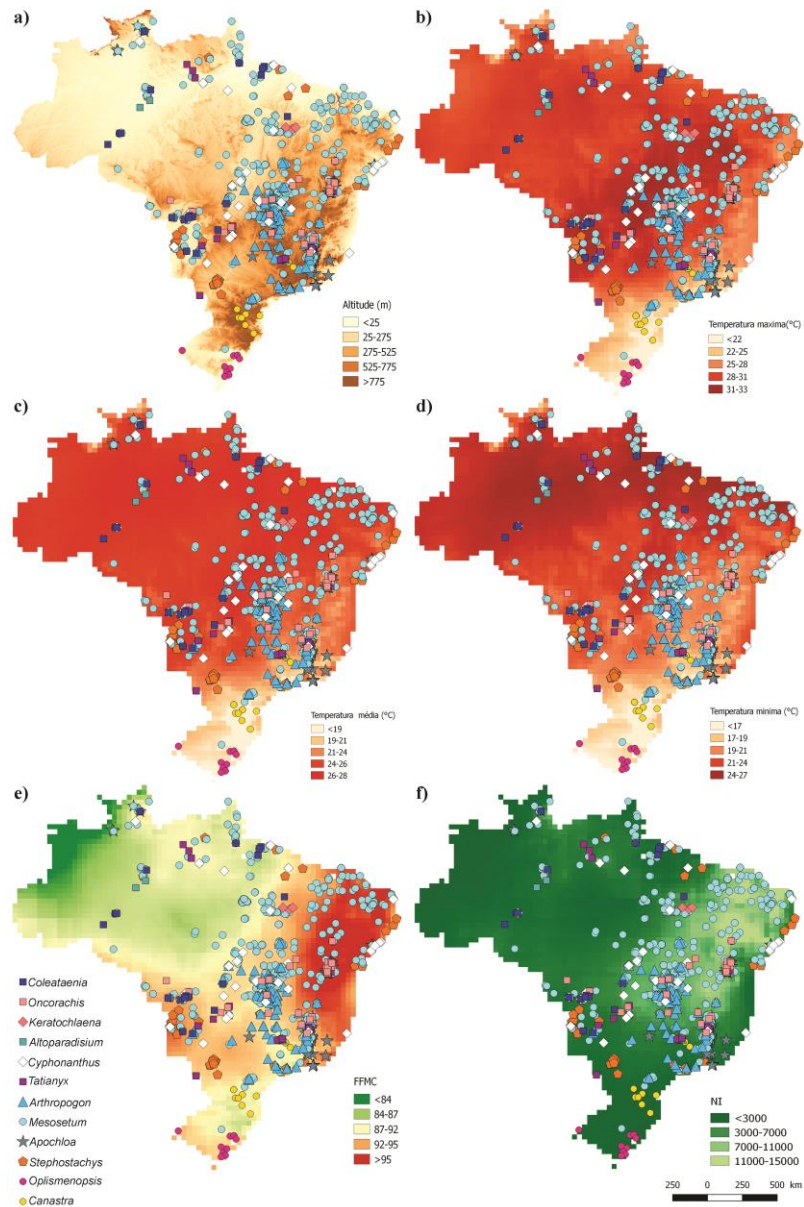
Fonte: Do autor (2017)

Figura 3. Valores medianos da ocorrência de gêneros da subtribo Arthropogoninae em relação à Temperatura Máxima (°C) (a), Altitude (m) (b), Temperatura Média (°C) (c), *Fine Fuel Moisture Code* (FFMC) (d), Temperatura Mínima (°C) (e) e Índice de Nesterov (NI) (f). Círculos brancos, espécies “Não C4”; Círculos pretos, espécies C4.



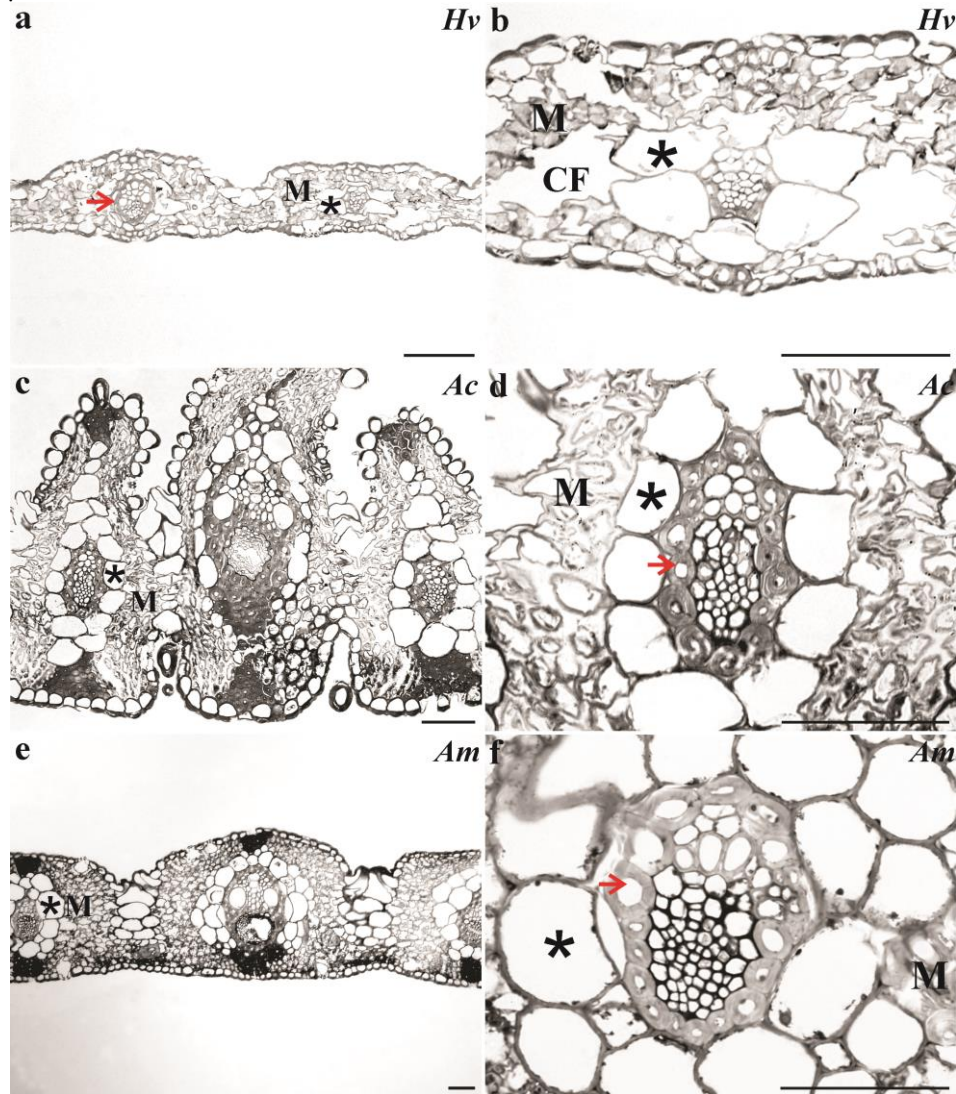
Fonte: Do autor (2017)

Figura 4. Distribuição geográfica de gêneros da subtribo Arthropogoninae em relação à Temperatura Máxima (°C) (a), Altitude (m) (b), Temperatura Média (°C) (c), *Fine Fuel Moisture Code (FFMC)* (d), Temperatura Mínima (°C) (e) e Índice de Nesterov (*NI*) (f).



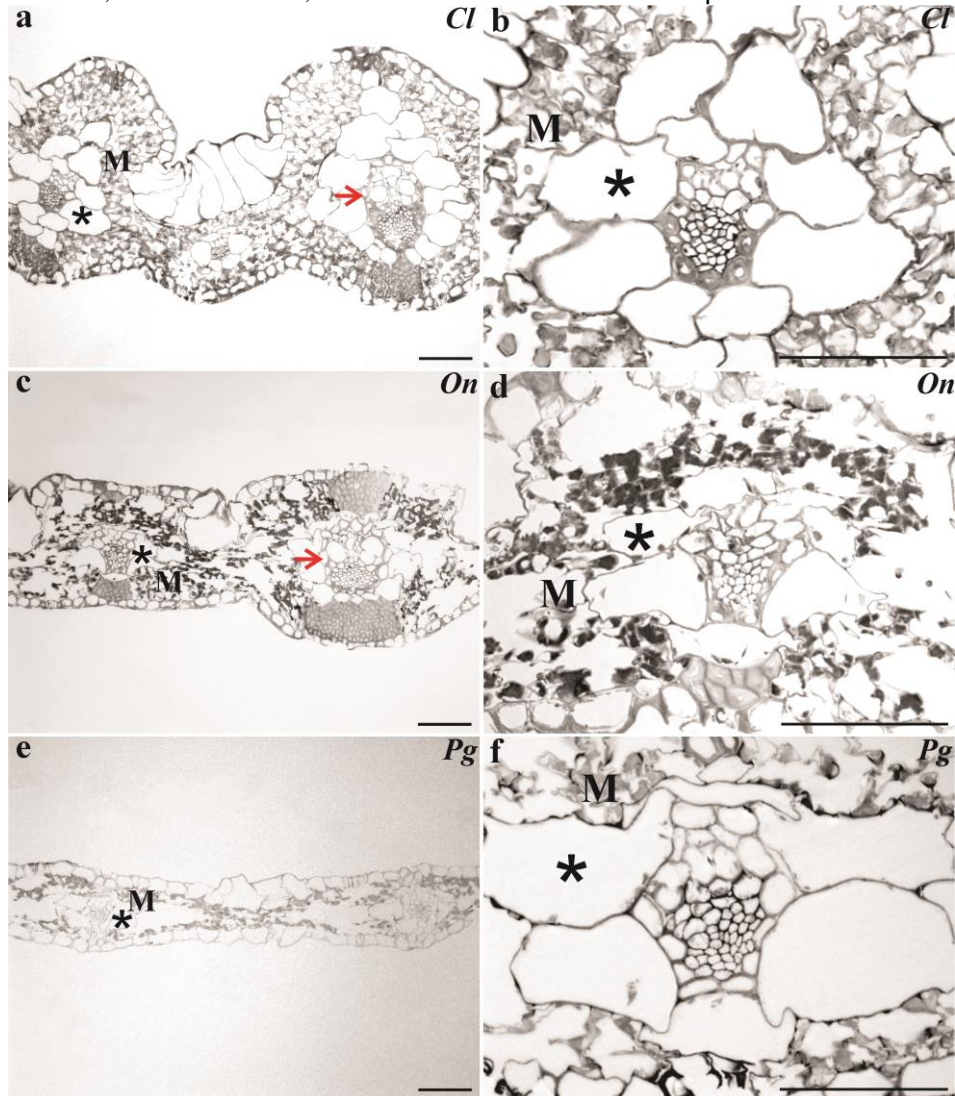
Fonte: Do autor (2017)

Figura 5. Secções foliares transversais de material herborizado reidratado das espécies “tipo C3” *Homolepis villaricensis* (Hv- a, b), *Apochloa cipoensis* (Ac- c, d) e *Apochloa molinioides* (Am- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática; CF, células fusóides. Barras= 50  $\mu$ m



Fonte: Do autor (2017)

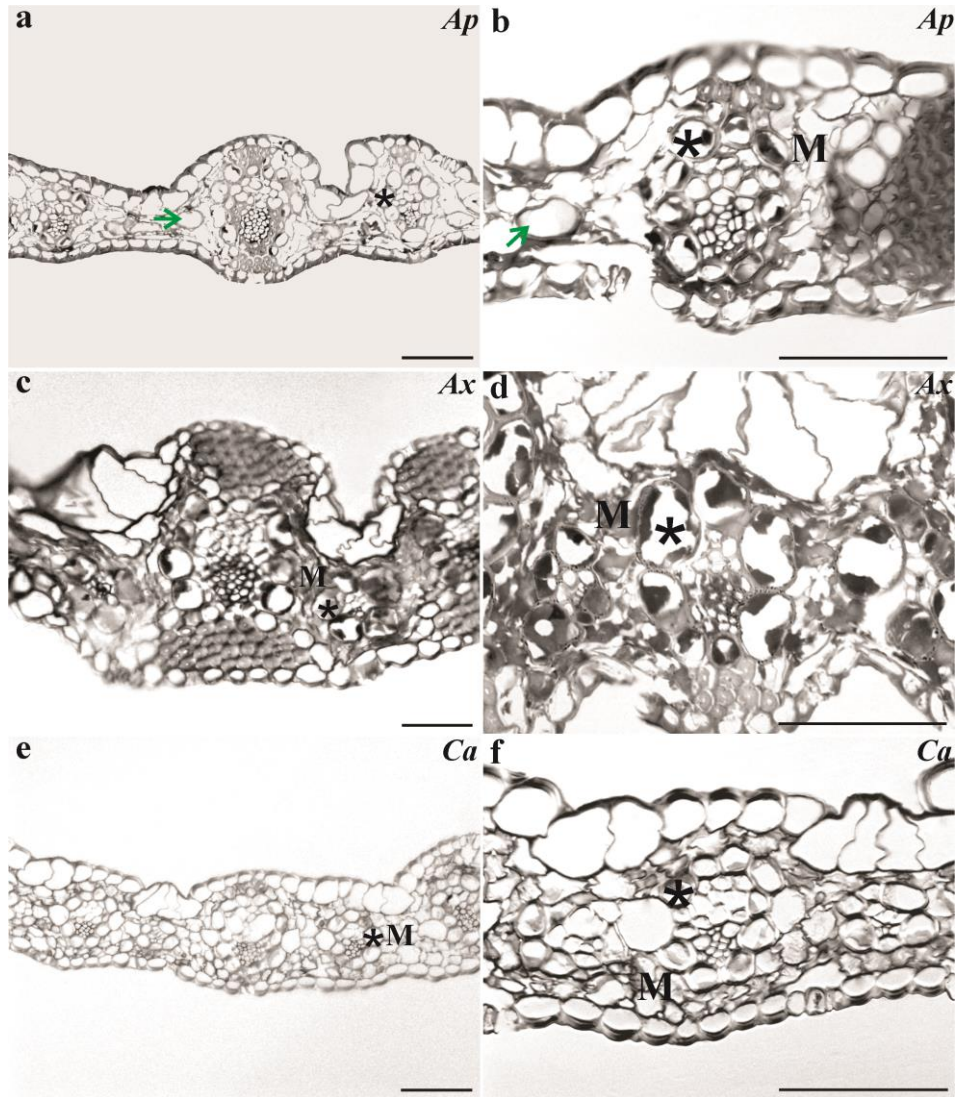
Figura 6. Secções foliares transversais de material herborizado reidratado das espécies “tipo C3” *Canastra lanceolata* (Cl- a, b), *Oplismenopsis najada* (On- c, d) e *Phanopyrum gymnocarpon* (Pg- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática. Barras= 50 µm



Fonte: Do autor (2017)

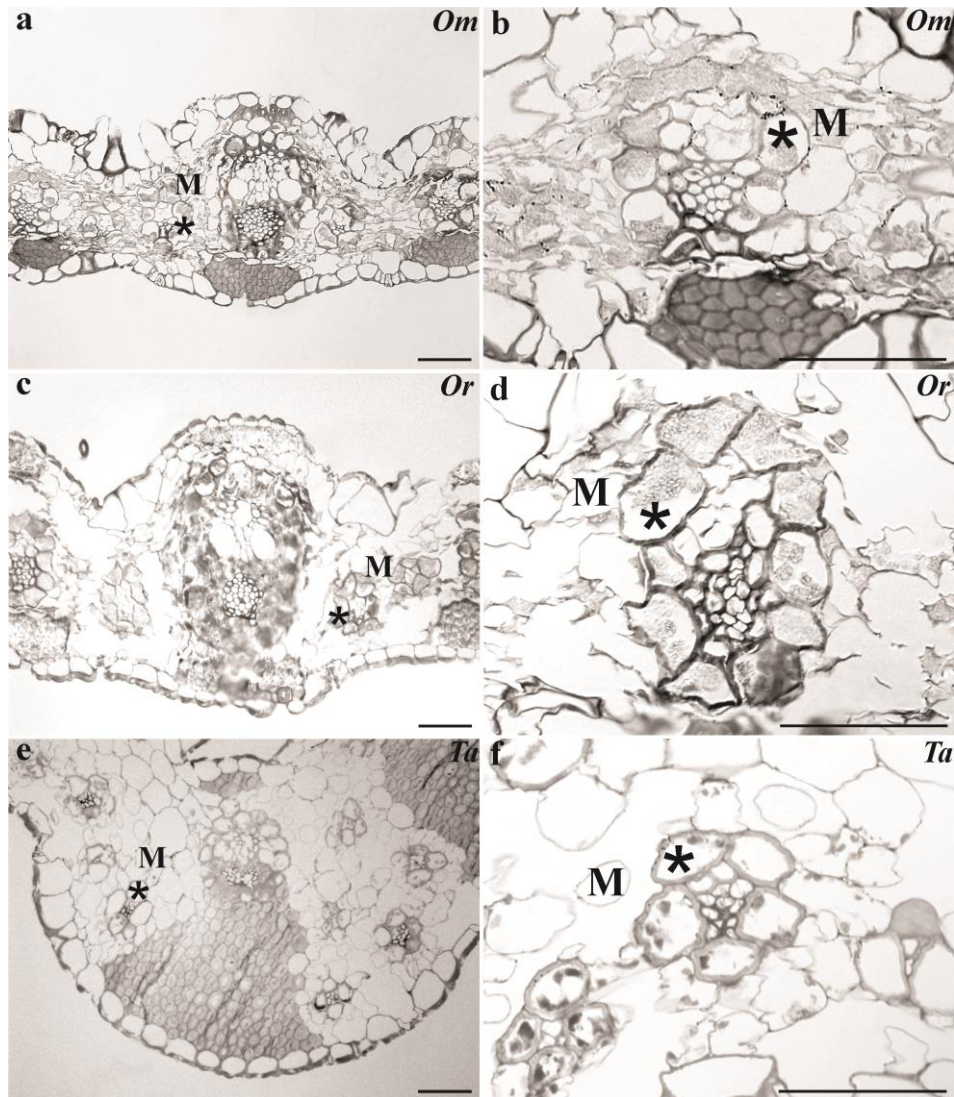


Figura 7. Secções foliares transversais de material herborizado reidratado das espécies “tipo C4” *Achlaena piptostachya* (Ap- a, b), *Arthropogon xerachne* (Ax- c, d) e *Coleataenia anceps* (Ca- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas verdes, células distintas. Barras= 50 µm



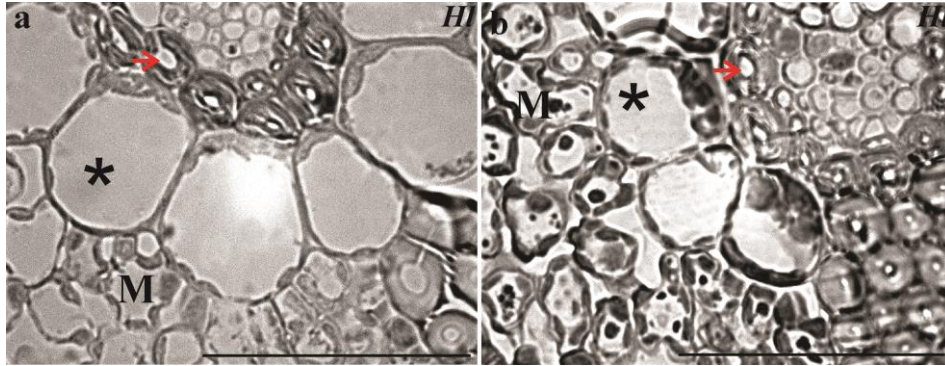
Fonte: Do autor (2017)

Figura 8. Secções foliares transversais de material herborizado reidratado das espécies “tipo C4” *Oncorachis macrantha* (*Om*- a, b), *Oncorachis ramosa* (*Or*- c, d) e *Tatianyx arnacites* (*Ta*- e, f) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular. Barras= 50 µm



Fonte: Do autor (2017)

Figura 9. Secções foliares transversais de *Homolepis longispicula* mostrando o posicionamento de organelas associado à parte interna da célula da bainha do feixe vascular (a e b) M, mesofilo; asterisco, bainha do feixe vascular; setas vermelhas, bainha mestomática. Barras= 50 µm



Fonte: Do autor (2017)

Tabela 3. Características anatômicas foliares para as espécies *Apochloa euprepes*, *Apochloa poliophylla*, *Homolepis glutinosa*, *Homolepis isocalyca*, *Homolepis aturensis*, *Homolepis longispicula*, *Mesosetum ferrugineum* e *Mesosetum loliiforme*. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Espécies                      | Distância entre feixes vasculares ( $\mu\text{m}$ ) | Número de células do mesofilo entre feixes vasculares | Células da Bainha do Feixe Vascular (%) | Células do Mesofilo (%)    | Razão Mesofilo: Bainha do Feixe Vascular |
|-------------------------------|---|---|---|----------------------------|--|
| <i>Apochloa euprepes</i>      | 217,5 $\pm$ 6,8 <sup>b</sup>                        | 6,85 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>                         | 24 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>              | 33 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>  | 1,50 $\pm$ 0,12 <sup>bc</sup>            |
| <i>Apochloa poliophylla</i>   | 200,8 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup>                        | 8,14 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>                         | 11 $\pm$ 0,4 <sup>bc</sup>              | 36 $\pm$ 0,5 <sup>ab</sup> | 3,37 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>             |
| <i>Homolepis glutinosa</i>    | 268,6 $\pm$ 7,8 <sup>a</sup>                        | 10,00 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>                         | 20 $\pm$ 0,6 <sup>ab</sup>              | 37 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup> | 1,93 $\pm$ 0,08 <sup>bc</sup>            |
| <i>Homolepis isocalyca</i>    | 191,0 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>                        | 8,00 $\pm$ 0,30 <sup>ab</sup>                         | 18 $\pm$ 0,5 <sup>bc</sup>              | 43 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>  | 2,41 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup>            |
| <i>Homolepis aturensis</i>    | 138,8 $\pm$ 6,3 <sup>c</sup>                        | 3,88 $\pm$ 0,40 <sup>bc</sup>                         | 21 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>              | 42 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup> | 2,10 $\pm$ 0,20 <sup>ab</sup>            |
| <i>Homolepis longispicula</i> | 114,7 $\pm$ 3,3 <sup>d</sup>                        | 2,11 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>                          | 31 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>               | 36 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup> | 1,10 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>             |
| <i>Mesosetum ferrugineum</i>  | 62,0 $\pm$ 2,2 <sup>e</sup>                         | 1,18 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>                          | 12 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>               | 15 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>  | 1,30 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>             |
| <i>Mesosetum loliiforme</i>   | 56,4 $\pm$ 2,1 <sup>e</sup>                         | 1,80 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>                          | 18 $\pm$ 0,5 <sup>bc</sup>              | 19 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>  | 1,07 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>             |

Fonte: Do autor (2017)

Tabela 4. Características ultraestruturais foliares para as espécies *Apochloa euprepes*, *Apochloa poliophylla*, *Homolepis isocalyca*, *Homolepis aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. ND, não definido. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Espécies                     | Células do Mesofilo              |   | Células da Bainha do Feixe Vascular |   |
|------------------------------|----------------------------------|---|-------------------------------------|---|
|                              | Área celular ( $\mu\text{m}^2$ ) | Espessura da parede celular ( $\mu\text{m}$ ) | Área celular ( $\mu\text{m}^2$ )    | Espessura da parede celular ( $\mu\text{m}$ ) |
| <i>Apochloa euprepes</i>     | 99,14 $\pm$ 7,67 <sup>b</sup>    | 0,44 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>                  | 641,81 $\pm$ 50,64 <sup>a</sup>     | 0,53 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>                  |
| <i>Apochloa poliophylla</i>  | 84,79 $\pm$ 6,22 <sup>bc</sup>   | 0,28 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                  | 633,08 $\pm$ 50,00 <sup>ab</sup>    | 0,37 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                  |
| <i>Homolepis glutinosa</i>   | ND                               | ND  | ND                                  | ND  |
| <i>Homolepis isocalyca</i>   | 113,25 $\pm$ 8,08 <sup>b</sup>   | 0,20 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>                  | 401,80 $\pm$ 32,76 <sup>b</sup>     | 0,25 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>                  |
| <i>Homolepis aturensis</i>   | 318,18 $\pm$ 23,65 <sup>a</sup>  | 0,14 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>                  | 733,71 $\pm$ 47,46 <sup>a</sup>     | 0,31 $\pm$ 0,01 <sup>bc</sup>                 |
| <i>Mesosetum ferrugineum</i> | 62,24 $\pm$ 3,92 <sup>c</sup>    | 0,25 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                  | 103,97 $\pm$ 5,81 <sup>c</sup>      | 0,70 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>                  |

Fonte: Do autor (2017)

Tabela 5. Características ultraestruturais foliares e de imunomarcacão para GDC nas células do mesofilo para as espécies *Apochloa euprepes*, *Apochloa poliophylla*, *Homolepis isocalycia*, *Homolepis aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. ND, não definido. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Células do Mesofilo/<br>Espécies | rea planar de mitocôndrias/<br>rea celular (%) | Número de mitocôndrias/<br>rea Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Densidade de imunomarcacão de GDC/<br>rea planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Densidade de imunomarcacão de GDC/<br>rea celular ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | rea planar de peroxissomos /<br>rea Celular (%) | Número de peroxissomos /<br>rea Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | rea planar de cloroplastos/<br>rea Celular (%) | Número de cloroplastos/<br>rea Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) |
|----------------------------------|--|--|--|---|---|---|--|--|
| <i>Apochloa euprepes</i>         | 1,16 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>                     | 50 $\pm$ 3 <sup>a</sup>  | 95,1 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>   | 1,05 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup>   | 0,34 $\pm$ 0,046 <sup>a</sup>                     | 17 $\pm$ 2,5 <sup>ab</sup>  | 23,3 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>                      | 60 $\pm$ 3 <sup>a</sup>  |
| <i>Apochloa poliophylla</i>      | 1,38 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>                     | 50 $\pm$ 3 <sup>a</sup>  | 114,0 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>   | 1,53 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>  | 0,54 $\pm$ 0,084 <sup>a</sup>                     | 27 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>   | 26,4 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>                      | 72 $\pm$ 3 <sup>a</sup>  |
| <i>Homolepis glutinosa</i>       | ND   | ND   | ND   | ND  | ND  | ND  | ND   | ND   |
| <i>Homolepis isocalycia</i>      | 1,26 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>                     | 70 $\pm$ 6 <sup>b</sup>  | 57,5 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>  | 0,71 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>  | 0,52 $\pm$ 0,084 <sup>a</sup>                     | 29 $\pm$ 4,6 <sup>a</sup>   | 22,1 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>                      | 60 $\pm$ 2 <sup>a</sup>  |

| Células do Mesofilo/<br>Espécies | Área planar de mitocôndrias/<br>Área celular (%) | Número de mitocôndrias/<br>Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Densidade de imunomarcacão de GDC/Área planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Densidade de imunomarcacão de GDC/Área celular ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Área planar de peroxissomos /<br>Área Celular (%) | Número de peroxissomos /<br>Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Área planar de cloroplastos/<br>Área Celular (%) | Número de cloroplastos/<br>Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) |
|----------------------------------|--|--|--|---|---|---|--|--|
| <i>Homolepis aturensis</i>       | 0,30±0,06 <sup>b</sup>                           | 20±2 <sup>b</sup>  | 1,3±0,3 <sup>c</sup>   | 0,0045±0,00 <sup>c</sup>  | 0,38±0,060 <sup>a</sup>                           | 7±1,2 <sup>b</sup>  | 17,7±1,2 <sup>b</sup>                            | 30±1 <sup>c</sup>  |
| <i>Mesosetum ferrugineum</i>     | 0,44±0,04 <sup>b</sup>                           | 60±7 <sup>a</sup>  | 8,6±1,6 <sup>c</sup>   | 0,04±0,00 <sup>c</sup>  | 0,012±0,005 <sup>b</sup>                          | 3±1,1 <sup>b</sup>  | 14,2±1,6 <sup>b</sup>                            | 49±3 <sup>b</sup>  |

Fonte: Do autor (2017)

Tabela 6. Características ultraestruturais foliares e de imunomarcção para GDC nas células da bainha do feixe vascular para as espécies *Apochloa euprepes*, *Apochloa poliophylla*, *Homolepis isocalyca*, *Homolepis aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. ND, não definido. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Células da Bainha do Feixe Vascular/ Espécies | Área planar de mitocôndrias/ Área celular (%) | Número de mitocôndrias/ Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Densidade de imunomarcção de GDC/Área planar de mitocôndrias ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Densidade de imunomarcção de GDC/Área celular ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Área planar de peroxissomos / Área Celular (%) | Número de peroxissomos / Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Área planar de cloroplastos/ Área Celular (%) | Número de cloroplastos/ Área Celular ( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) |
|---|---|---|---|--|--|--|---|---|
| <i>Apochloa euprepes</i>                      | 0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                  | 10 $\pm$ 0 <sup>b</sup>   | 23,6 $\pm$ 2,6 <sup>c</sup>   | 0,02 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>   | 0,002 $\pm$ 0,001 <sup>c</sup>                 | 0,44 $\pm$ 0 <sup>b</sup>  | 0,6 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>                    | 10 $\pm$ 1 <sup>c</sup>   |
| <i>Apochloa poliophylla</i>                   | 0,08 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>                  | 10 $\pm$ 0 <sup>b</sup>   | 14,4 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>   | 0,01 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>   | 0,008 $\pm$ 0,002 <sup>c</sup>                 | 2 $\pm$ 0 <sup>b</sup>   | 0,5 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>                    | 10 $\pm$ 1 <sup>c</sup>   |
| <i>Homolepis glutinosa</i>                    | ND  | ND  | ND  | ND   | ND   | ND   | ND  | ND  |
| <i>Homolepis isocalyca</i>                    | 0,55 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>                  | 30 $\pm$ 3 <sup>a</sup>   | 112,3 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>  | 0,60 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>   | 0,0064 $\pm$ 0,010 <sub>b</sub>                | 6 $\pm$ 1 <sup>a</sup>   | 2,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>                    | 20 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>   |



| Células da<br>Bainha do<br>Feixe<br>Vascular/<br>Espécies | Área planar<br>de<br>mitocôndrias/<br>Área celular<br>(%) | Número de<br>mitocôndrias/<br>Área Celular<br>( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Densidade de<br>imunomarcção<br>de GDC/Área<br>planar de<br>mitocôndrias<br>( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Densidade de<br>imunomarcção<br>de GDC/Área<br>celular ( $\mu\text{m}^{-2}$ ) | Área planar<br>de<br>peroxissomos<br>/<br>Área Celular<br>(%) | Número de<br>peroxissomos<br>/<br>Área<br>Celular<br>( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) | Área planar<br>de<br>cloroplastos/<br>Área Celular<br>(%) | Número de<br>cloroplastos/<br>Área Celular<br>( $\mu\text{m}^{-2} \cdot 10^{-3}$ ) |
|---|---|--|--|---|---|---|---|--|
| <i>Homolepis<br/>aturensis</i> *                          | 0,73±0,06 <sup>a</sup>                                    | 30±3 <sup>a</sup>  | 47,2±2,1 <sup>b</sup>  | 0,35±0,03 <sup>a</sup>  | 0,23±0,020 <sup>a</sup>                                       | 7±1 <sup>a</sup>  | 8,3±0,7 <sup>a</sup>                                      | 20±1 <sup>b</sup>  |
| <i>Mesosetum<br/>ferrugineum</i>                          | 0,54±0,05 <sup>a</sup>                                    | 50±4 <sup>a</sup>  | 22,1±2,0 <sup>c</sup>  | 0,12±0,01 <sup>b</sup>  | 0,10±0,021 <sup>b</sup>                                       | 9±1 <sup>a</sup>  | 17,6±1,2 <sup>a</sup>                                     | 30±1 <sup>a</sup>  |

Fonte: Do autor (2017)

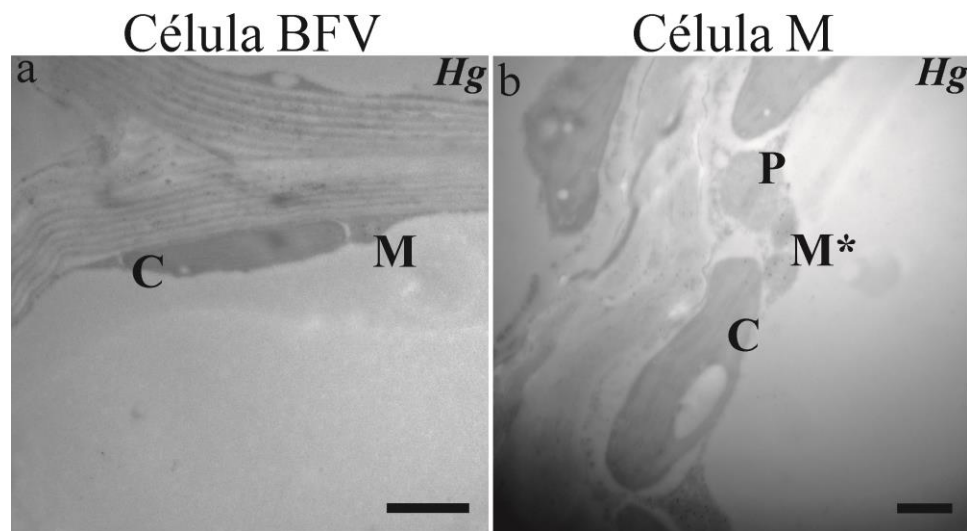
Tabela 7. Características do posicionamento de organelas em células da bainha do feixe vascular para as espécies *Apochloa euprepes*, *Apochloa poliophylla*, *Homolepis isocalycia*, *Homolepis aturensis* e *Mesosetum ferrugineum*. ND, não definido. Dados representados pelas médias  $\pm$  erro padrão. Letras iguais não apresentam diferenças estatísticas pela ANOVA e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

| Células da Bainha do Feixe Vascular/ Espécies | Cloroplastos associados com a porção interna da parede celular (%) | Mitocôndrias associados com a porção interna da parede celular (%) | Peroxisomos associados com a porção interna da parede celular (%) | Cloroplastos cobrindo a porção interna da parede celular (%) | Mitocôndrias cobrindo a porção interna da parede celular (%) | Peroxisomos cobrindo a porção interna da parede celular (%) |
|---|--|--|---|--|--|---|
| <i>Apochloa euprepes</i>                      | 37 $\pm$ 5 <sup>b</sup>  | 54 $\pm$ 5 <sup>b</sup>  | 34 $\pm$ 7 <sup>b</sup>   | 0,21 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>                                 | 0,06 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>                                 | 0,0 $\pm$ 0,0 <sup>b</sup>                                  |
| <i>Apochloa poliophylla</i>                   | 38 $\pm$ 5 <sup>b</sup>  | 58 $\pm$ 5 <sup>b</sup>  | 20 $\pm$ 8 <sup>b</sup>   | 0,16 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>                                 | 0,05 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>                                 | 0,0009 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>                              |
| <i>Homolepis glutinosa</i>                    | ND   | ND   | ND  | ND   | ND   | ND  |
| <i>Homolepis isocalycia</i>                   | 55 $\pm$ 4 <sup>ab</sup>   | 92 $\pm$ 1 <sup>a</sup>  | 82 $\pm$ 7 <sup>a</sup>   | 1,23 $\pm$ 0,10 <sup>bc</sup>                                | 0,50 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>                                 | 0,001 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>                               |

| Células da Bainha do Feixe Vascular/<br>Espécies | Cloroplastos associados com a porção interna da parede celular (%) | Mitocôndrias associados com a porção interna da parede celular (%) | Peroxisomos associados com a porção interna da parede celular (%) | Cloroplastos cobrindo a porção interna da parede celular (%) | Mitocôndrias cobrindo a porção interna da parede celular (%) | Peroxisomos cobrindo a porção interna da parede celular (%) |
|--|--|--|---|--|--|---|
| <i>Homolepis aturensis</i> *                     | 61±3 <sup>a</sup>  | 99±0,2 <sup>a</sup>  | 95±3 <sup>a</sup>   | 5,10±0,51 <sup>a</sup>                                       | 0,73±0,06 <sup>a</sup>                                       | 0,04±0,02 <sup>a</sup>                                      |
| <i>Mesosetum ferrugineum</i>                     | 12±3 <sup>c</sup>  | 25±4 <sup>c</sup>  | 30±8 <sup>b</sup>   | 1,82±0,61 <sup>b</sup>                                       | 0,15±0,04 <sup>b</sup>                                       | 0,005±0,00 <sup>b</sup>                                     |

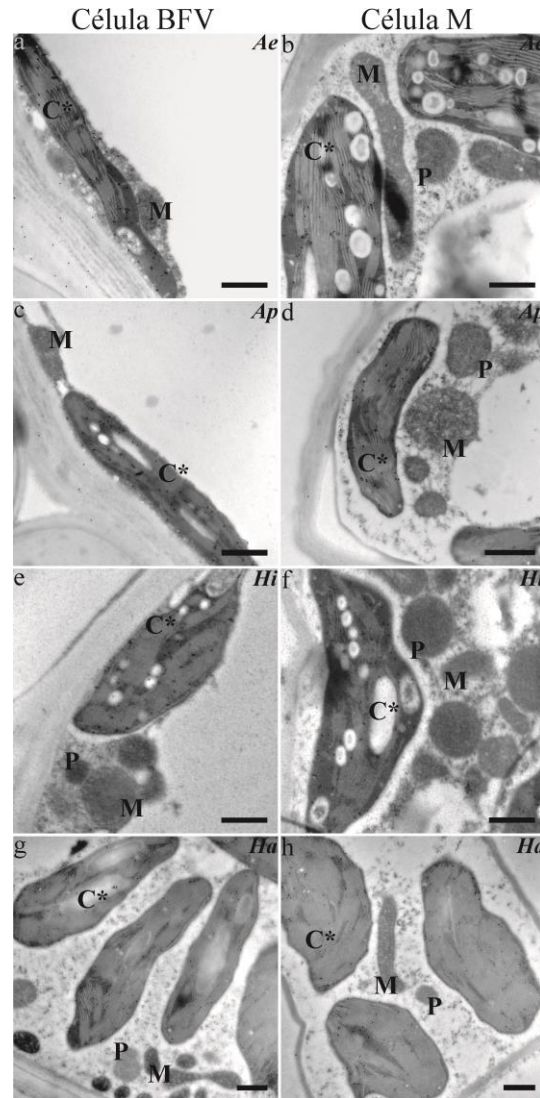
Fonte: Do autor (2017)

Figura 10 - Ultraestrutura e imunomarcção de GDC em células da bainha do feixe vascular- BFV (a) e células do mesofilo- M (b) para a espécie *Homolepis glutinosa* (Hg- a, b). C, cloroplasto; M, mitocôndria; M\*, mitocôndria imunomarcada com GDC; P, peroxissomo. Barras=500nm.



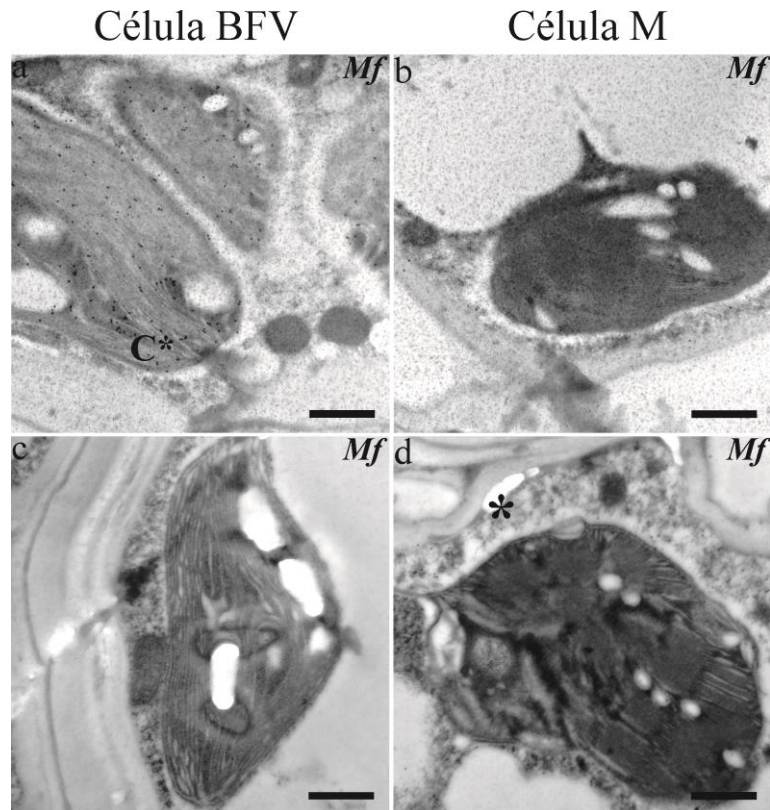
Fonte: Do autor (2017)

Figura 11- Ultraestrutura e imunomarcação de Rubisco em células da bainha do feixe vascular- BFV (a, c, e, g) e células do mesófilo- M (b, d, f, h) para as espécies *Apochoa euprepes* (Ae- a, b), *Apochoa poliophylla* (Ap- c, d), *Homolepis isocalyca* (Hi- e, f), *Homolepis aturensis* (Ha- g, h). C, cloroplasto; C\*, cloroplasto imunomarcado com Rubisco; M, mitocôndria; P, peroxissomo. Barras=500nm.



Fonte: Do autor (2017)

Figura 12- Ultraestrutura e imunomarcção de Rubisco (a, b) e PEPc (c, d) em células da bainha do feixe vascular- BFV (a, c) e células do mesófilo- M (b, d) para a espécie *Mesosetum ferrugineum* (Mf). C\*, cloroplasto imunomarcado com Rubisco; asterisco, citosol imunomarcado com PEPc. Barras=500nm.



Fonte: Do autor (2017)