

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA

Jéssica Mena Barreto de Freitas

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONTAGEM CROMOSSÔMICA,
MEDIDAS ESTOMÁTICAS E GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum
rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (POACEAE)**

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Jéssica Mena Barreto de Freitas

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONTAGEM CROMOSSÔMICA, MEDIDAS
ESTOMÁTICAS E GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex
G.H. Rua & Valls (POACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientadora: Prof^ª Dra Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil
2019

Freitas, Jéssica Mena Barreto de
DIVERSIDADE GENÉTICA, CONTAGEM CROMOSSÔMICA, MEDIDAS
ESTOMÁTICAS E GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum rawitscheri*
(Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (POACEAE) / Jéssica
Mena Barreto de Freitas.- 2019.
85 f.; 30 cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco
Coorientadora: Liliana Essi
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Agrobiologia, RS, 2019

1. *Paspalum rawitscheri* 2. Diversidade Genética 3.
Contagem Cromossômica 4. Caracteres Morfológicos 5.
Viabilidade Polínica I. Bosio Tedesco, Solange II. Essi,
Liliana III. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo autor.

© 2019

Todos os direitos reservados a Jéssica Mena Barreto de Freitas. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Cândido Portinari, 395/201, Camobi, Santa Maria – RS.

CEP: 97105-040


E-mail: jessicamenabarretofreitas@gmail.com

Jéssica Mena Barreto de Freitas

**DIVERSIDADE GENÉTICA, CONTAGEM CROMOSSÔMICA, MEDIDAS
ESTOMÁTICAS E GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex
G.H. Rua & Valls (POACEAE)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Aprovado em 08 de março de 2019:



Solange Bosio Tedesco, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Thais Scotti do Canto-Dorow, Dr^a (UFN)



Viviane Dal-Souto Frescura, Dr^a (UFSM-CS)

Santa Maria, RS
2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo cuidado sempre a mim concedido.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida, me oferecendo apoio, amor e carinho.

À Prof^a Dr^a Solange Bosio Tedesco, pela orientação e auxílio em toda a minha jornada acadêmica, obrigada pelo apoio e amizade.

À Prof^a Dr^a Liliana Essi, por todos os ensinamentos e por ter acreditado no meu potencial.

À Universidade Federal de Santa Maria, por ter me proporcionado um ensino de qualidade e gratuito.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Kelen, por todas as dicas no laboratório, e por ser sempre solícita quando precisei.

À Prof^a Dr^a Viviane Dal-Souto Frescura, pela amizade e por estar sempre disposta a me auxiliar nos momentos de dúvidas.

Aos meus amigos, que compreenderam os momentos de ausência, e que sempre acreditaram em mim.

À minha amiga e colega de laboratório Andrielle, por acreditar no meu trabalho e me apoiar em todos os momentos.

À minha grande amiga Karine, pela amizade, companheirismo e carinho durante toda a jornada acadêmica.

Às minhas colegas do LABCITOGEN, Suany, Luísa, Julia e Carmine, pelo apoio e por tornarem os dias difíceis de trabalho muito mais divertidos.

Muito Obrigada!

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA, CONTAGEM CROMOSSÔMICA, MEDIDAS ESTOMÁTICAS E GRÃOS DE PÓLEN DE *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (POACEAE)

AUTORA: JÉSSICA MENA BARRETO DE FREITAS
ORIENTADORA: PROF^a DR^a SOLANGE BOSIO TEDESCO

Estudos de caracterização, conservação e avaliação de riscos de extinção em espécies vegetais são cada vez mais necessários para a proteção da biodiversidade no Brasil. A gramínea *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, que ocorre na região Sul do Brasil, encontra-se ameaçada de extinção. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi fornecer subsídios para a caracterização genética e citogenética de *Paspalum rawitscheri* (Poaceae), com vista à busca de estratégias de conservação e manejo. Foram coletadas amostras das populações para a análise de diversidade genética: Santa Maria (24 indivíduos), São Martinho da Serra (36 indivíduos), Campestre da Serra (46 indivíduos) e Vacaria (9 indivíduos), além de material testemunho para depósito no herbário SMDB. A análise da diversidade genética foi realizada através da comparação de padrões de ISSR entre indivíduos de diferentes populações, os quais foram visualizados em gel de agarose 1,5%. Para contagem cromossômica e avaliação do nível de ploidia foram utilizadas inflorescências jovens da população de Santa Maria para confecção das lâminas. Para análise da viabilidade e medição dos polens foram utilizadas inflorescências de das populações de Santa Maria e de Campestre da Serra para a confecção das lâminas, sendo avaliados apenas dois indivíduos por população. Foram utilizadas as folhas frescas de dois indivíduos por população, Santa Maria, São Martinho da Serra e Campestre da Serra, para a análise das medidas estomáticas, essa avaliação foi feita por meio do método de impressão epidérmica da face adaxial da folha. A análise estatística dos marcadores moleculares foi realizada com os softwares Structure e GenAlEx. A comparação da média da viabilidade polínica, das medidas estomáticas e de grãos de pólen, dos diferentes indivíduos, foi feita pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. As populações analisadas apresentaram taxas de polimorfismo bastante variadas entre as populações (entre 29,26 a 67,48%), baixa diversidade genética ($h = 0,130$ a $0,217$) e baixa estrutura populacional. A análise Bayesiana determinou que os indivíduos estão inseridos em quatro clusters, havendo uma mistura nos agrupamentos. As medidas estomáticas e de grãos de pólen das populações apresentaram diferença significativa, principalmente em relação à altura (diâmetro equatorial), onde ocorreu variação entre todas as populações analisadas. Para a viabilidade polínica o corante Reativo de Alexander demonstrou diferença significativa entre as populações de Santa Maria e Campestre da Serra. A população de Santa Maria apresentou-se como diploide, $2n = 20$ cromossomos, sendo a única população que foi possível ser feita a contagem cromossômica. Conclui-se que as populações de *P. rawitscheri* apresentam baixa estrutura populacional, com diversidade genética baixa e viabilidade polínica reduzida para uma população. Esses dados podem implicar em uma contínua redução populacional para a espécie. Com a diferença mais acentuada entre as medidas dos estômatos e dos grãos de pólen entre Santa Maria e Campestre da Serra, pode ocorrer diferença de ploidia entre essas populações, tendo indivíduos poliploides na espécie *P. rawitscheri*.

Palavras-chave: Espécie Ameaçada de Extinção. ISSR. Ploidia. Conservação.

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY, CHROMOSOMAL COUNT, STOMATIC MEASURES AND POLLEN GRAINS OF *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (POACEAE)

AUTHOR: JÉSSICA MENA BARRETO DE FREITAS
ADVISER: PROF^a DR^a SOLANGE BOSIO TEDESCO

Studies on the characterization, conservation and evaluation of extinction risks in plant species are increasingly necessary for the protection of biodiversity in Brazil. The grass *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, which occurs in southern Brazil, is threatened with extinction. In this sense, the objective of this work was to provide subsidies for the genetic and cytogenetic characterization of *Paspalum rawitscheri* (Poaceae), in order to search conservation and management strategies. Samples were collected for analysis of genetic diversity: Santa Maria (24 individuals), São Martinho da Serra (36 individuals), Campestre da Serra (46 individuals) and Vacaria (9 individuals), as well as testimonial material for deposition in the herbarium SMDB. Genetic diversity analysis was performed by comparing ISSR patterns among individuals from different populations, which were visualized on 1.5% agarose gel. For chromosome counting and evaluation of the level of ploidy, young inflorescences of Santa Maria population were used to make the slides. For the analysis of the viability and measurement of the pollen, inflorescences of the populations of Santa Maria and Campestre da Serra were used for the preparation of the slides, being evaluated only two individuals per population. The fresh leaves of two individuals per population, Santa Maria, São Martinho da Serra and Campestre da Serra, were used for the analysis of the stomatal measurements, this evaluation was done through the epidermal impression method of the adaxial leaf face. Statistical analysis of the molecular markers was performed with the Structure and GenAIEx softwares. The comparison of the pollen viability, stomatal measurements and pollen grains of the different individuals was done using the Tukey test at a 5% probability of error. The analyzed populations presented widely varied polymorphism rates between the populations (between 29,26 to 67,48%), low genetic diversity ($h = 0,130$ to $0,217$) and low population structure. The Bayesian analysis determined that the individuals are inserted in four clusters, with admixture in the clusters. The stomatal and pollen grains of the populations showed a significant difference, mainly in relation to the height (equatorial diameter), where variation occurred among all the analyzed populations. For the pollen viability the Alexander reactive dye showed a significant difference between the populations of Santa Maria and Campestre da Serra. The population of Santa Maria presented as diploid, $2n = 20$ chromosomes, being the only population that could be made the chromosome count. It is concluded that the populations of *P. rawitscheri* present low population structure, with low genetic diversity and reduced pollen viability for a population. These data may imply a continuous population reduction for the species. With the most pronounced difference between stomata and pollen grains between Santa Maria and Campestre da Serra, there may be a difference in ploidy between these populations, with polyploid individuals in the *P. rawitscheri* species.

Key-words: Threatened Species of Extinction. ISSR. Ploidia. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls em campo, no município de Santa Maria, RS.....16

ARTIGO 1

Figura 1 - Distribuição geográfica das populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, do Rio Grande do Sul, utilizadas nesse estudo. SM - Santa Maria; SMS - São Martinho da Serra; CS - Campestre da Serra; V-Vacaria.....28

Figura 2 - Análise Bayesiana do agrupamento genético entre populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls obtidas pelo programa STRUCTURE (K=4). População 1 – Santa Maria; População 2 – São Martinho da Serra; População 3 – Campestre da Serra; População 4 – Vacaria.....33

Figura 3 - Distribuição em clusters dos indivíduos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls obtida pelo programa STRUCTURE.....33

ARTIGO 2

Figura 1 - *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls: a) célula em metáfase I apresentando $n = x = 10$; b) célula em metáfase I apresentando $n = x = 10$. Escala: 10 μm48

ARTIGO 3

Figura 1 - Estômatos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls. A) Estômato da localidade de Santa Maria, RS; B) Estômato da localidade de São Martinho da Serra, RS; C) Estômato da localidade de Campestre da Serra, RS. Escala representa 2,5 μm69

Figura 2 - Grãos de pólen de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls. A) grão de pólen viável corado com orceína acética 2%; B) grão de pólen inviável corado com orceína acética 2%; C) grão de pólen viável corado com carmim acético 2%; D) grão de pólen inviável corado com carmim acético 2%; E) grão de pólen viável corado com reativo de Alexander; F) grão de pólen inviável corado com reativo de Alexander. Escala representa 2,5 μm70

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1 - Lista de acessos da espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls utilizados no estudo.....27
- Tabela 2 - Lista de *primers* utilizados no estudo de variabilidade genética da espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.....29
- Tabela 3 - Médias calculadas para os índices de diversidade genética.....30
- Tabela 4 - Quadro de análise da variância molecular (AMOVA) para quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls com dados de seis *primers* ISSR.....32

ARTIGO 3

- Tabela 1 - Indivíduos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls utilizados para análise do tamanho dos estômatos e do tamanho dos grãos de pólen.....65
- Tabela 2 - Médias das alturas e larguras dos estômatos e grãos de pólen das populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.....66
- Tabela 3 - Médias das alturas e larguras dos estômatos e grãos de pólen dos indivíduos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.....67
- Tabela 4 - Viabilidade polínica de populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.....68

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A -	Detalhe da inflorescência de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, no município de Santa Maria, RS (Fonte: Prof ^a Liliana Essi).....	84
APÊNDICE B -	Detalhe da base das folhas de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls em casa de vegetação, com bainhas contendo tricomas pulgentes e decíduos, oriundas do município de São Martinho da Serra, RS (Fonte: Acervo pessoal).....	84
APÊNDICE C -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> F4).....	85
APÊNDICE D -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> i.5).....	85
APÊNDICE E -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> O4).....	86
APÊNDICE F -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> P3).....	86
APÊNDICE G -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> P4).....	87
APÊNDICE H -	Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (<i>primer</i> P7).....	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos.....	14
1.1.1	Objetivo geral.....	14
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Gênero <i>Paspalum</i> L.....	15
2.2	<i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex. G.H. Rua & Valls.....	16
2.3	Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).....	17
2.4	Caracteres citogenéticos: número cromossômico e comportamento meiótico.....	19
2.5	Medidas estomáticas, diâmetro do grão de pólen e poliploidia.....	20
2.6	Caracterização da viabilidade polínica.....	21
3	ARTIGO 1 - Diversidade genética de populações naturais de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (Paspalae, Poaceae) do Rio Grande do Sul.....	24
	Resumo.....	24
	Abstract.....	25
	Introdução.....	25
	Material e Métodos.....	27
	Análise Estatística.....	29
	Resultados.....	30
	Discussão.....	33
	Agradecimentos.....	36
	Referências.....	36
4	ARTIGO 2 - Número cromossômico de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (Poaceae), em uma população localizada no município de Santa Maria, RS.....	40
	Resumo.....	40
	Abstract.....	41
	Agradecimentos.....	44
	Declaração de Conflitos de Interesse.....	45
	Referências.....	45
5	ARTIGO 3 - Medidas de estômatos, medidas de grãos de pólen e viabilidade polínica de <i>Paspalum rawitscheri</i> (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.....	49
	Resumo.....	49
	Abstract.....	50
	Introdução.....	51
	Material e Métodos.....	53
	Resultados e Discussão.....	55
	Conclusão.....	59
	Declaração de Conflitos de Interesse.....	60
	Referências.....	60
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	74
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	84

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre a flora brasileira são necessários para um maior conhecimento sobre a diversidade, a importância e a conservação de espécies. O Brasil é um país mundialmente conhecido por apresentar uma enorme biodiversidade vegetal e alto número de espécies endêmicas, mas com grandes problemas ambientais. A redução progressiva de populações de espécies de plantas nativas no Brasil serve como alerta para pesquisadores e ambientalistas, sobre a possibilidade de extinção de parte dessa riqueza.

A extinção é um processo natural, ao qual todos os seres vivos estão sujeitos, no entanto, esse processo é acelerado devido à intervenção humana (ROOS, 2012). A perda ou fragmentação de habitats, a inserção em massa de espécies exóticas em áreas nativas, superexploração de áreas e recursos naturais, e crescimento populacional descontrolado (SALATI et al., 2006), são os principais causadores da redução de espécies nativas e destruição da biodiversidade.

Arelado a isso, encontra-se o efeito gargalo de garrafa, que explica a perda de variabilidade genética através da redução drástica de uma determinada população, por intermédio da morte de indivíduos ou do impedimento de sua reprodução. A endogamia também está relacionada à ameaça ou extinção de populações, já que dela resulta o cruzamento entre espécies aparentadas, causando a alteração da constituição genética da população (QUEIROZ et al., 2000). Esse contexto justifica o estudo de espécies ameaçadas de extinção, com o propósito de mostrar a importância da conservação e caracterização desses indivíduos.

O estudo da variabilidade genética é importante para avaliar as proximidades e limites entre espécies, estimar níveis de migração e dispersão de plantas (AVISE, 1994) e avaliar a diversidade genética nas populações. Também traz informações sobre modo reprodutivo, distribuição e história evolutiva das espécies (KIM et al., 2008). A variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência, possibilitando que os indivíduos de uma determinada espécie consigam enfrentar as mudanças que ocorrem no ambiente em que vivem (RIBEIRO; RODRIGUES, 2006).

Alguns autores como Ellis et al. (2006), afirmam ainda que, diferente do que muitos pesquisadores acreditam, espécies raras ou ameaçadas podem apresentar alta diversidade genética. Níveis elevados de diversidade genética podem estar relacionados a uma adaptação específica do sistema genético de uma espécie, refletindo em fluxo gênico recorrente durante as gerações, e também a altas taxas de cruzamentos. Além disso, a conservação de uma alta

diversidade em espécies ameaçadas pode ser associada a recentes fragmentações e isolamentos das populações (ZAWKO et al., 2001; SILVA et al., 2016).

Diante disso, estudos realizados com marcadores moleculares podem trazer informações sobre a diversidade genética, a distribuição das populações, e a estrutura das diferentes populações, com acesso direto ao genoma do organismo. Há diversos tipos de marcadores moleculares, os quais podem ser obtidos por sequenciamento de DNA, hibridizações ou por simples amplificação, por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Dentre os marcadores obtidos por amplificação e leitura em gel, há dois tipos principais, classificados como dominantes e codominantes. Os marcadores codominantes são aqueles que demonstram a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos (LAURENTIN, 2009) e os dominantes são aqueles que possuem presença ou ausência de uma ou mais bandas, que podem ser consideradas como fenótipos (FOLL; GAGGIOTTI, 2008).

Considerando a diversidade da flora nativa brasileira, há poucos estudos avaliando a diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção (CARDOSO et al., 1998; COLLEVATTI et al., 2001; SOUZA; LOVATO, 2010). Em geral, há carência de dados sobre genética e biologia destas espécies, o que dificulta a tomada de decisões sobre estratégias de conservação. Dentre as dezenas de espécies de gramíneas ameaçadas de extinção (BRASIL, 2014), quatro pertencem ao gênero *Paspalum*: *Paspalum biaristatum* Filg. & Davidse, *Paspalum longiaristatum* Davidse & Filg., *Paspalum niquelandiae* Filg. e *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.

O gênero *Paspalum* L. é um grupo preferencialmente campestre, que tem ganhado cada vez mais visibilidade, já que possui grande importância econômica. Pesquisas estão sendo realizadas com enfoque na estrutura populacional para espécies desse gênero, que nas últimas décadas têm sido avaliadas através de marcadores moleculares como ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (CIDADE et al., 2008), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) (SAWASATO et al., 2008) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (SARTOR et al., 2013).

Além dos marcadores moleculares, outros parâmetros podem ser utilizados para caracterização de um germoplasma tais como morfológicos, bioquímicos, genéticos e citogenéticos (REIS, 2008). A combinação de estudos genéticos, taxonômicos e reprodutivos para a caracterização da diversidade do gênero *Paspalum*, que é destaque no grupo das forragens, torna-se interessante e de grande importância (HUBER, 2015). Análises citológicas e genéticas trazem informações importantes sobre a variabilidade e evolução de espécies, auxiliando em estudos de taxonomia e filogenia.

Através de estudos citogenéticos, como a contagem cromossômica, pode-se inferir níveis de ploidia, realizar-se a avaliação do comportamento meiótico e investigações sobre hibridizações (TEDESCO, 2000). Além disso, a avaliação da viabilidade polínica é um método que também apresenta informações relevantes quanto à fertilidade da planta, auxiliando nas escolhas de possíveis progenitores masculinos, contribuindo em programas de melhoramento de plantas (FRESCURA et al., 2012; CABRAL et al., 2013). Para determinação dos níveis de ploidia também pode-se utilizar uma técnica que avalia caracteres citoanatômicos e morfológicos, com análise de características da planta como, por exemplo, tamanho de estômatos foliares e diâmetro de grãos de pólen (TEDESCO et al., 1999; VICHATO et al., 2006).

O gênero *Paspalum* apresenta $x = 10$ como número básico de cromossomos (BURTON, 1940), com níveis de ploidia variando entre as espécies, de diploides a hexaploides (BURTON, 1940; PAGLIARINI et al., 2001; ADAMOWSKI et al., 2005; POZZOBON et al., 2008). Essa alta poliploidia desperta interesse de pesquisadores para estudos citogenéticos e de caracterização do nível de ploidia de diferentes espécies, para futura utilização destes indivíduos em pesquisas de melhoramento genético e hibridações. Não foram encontrados dados na literatura sobre o nível de ploidia das espécies ameaçadas de extinção pertencentes a esse gênero, tornando-se crucial a determinação do número cromossômico e avaliação do comportamento meiótico dessas espécies.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Fornecer subsídios para a caracterização genética e citogenética de *Paspalum rawitscheri* (Poaceae), com vista à busca de estratégias de conservação e manejo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Conhecer o tamanho e a diversidade genética de populações naturais de *P. rawitscheri*.
- Realizar a contagem cromossômica de populações naturais de *P. rawitscheri*.
- Analisar a viabilidade polínica de populações naturais de *P. rawitscheri*.
- Determinar o tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen de diferentes indivíduos de *P. rawitscheri* para avaliação dos níveis de ploidia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Paspalum* L.

Paspalum (Poaceae) é considerado um dos principais gêneros dentro da tribo Paspaleae (SORENG et al., 2015) e abrange plantas com grande valor forrageiro (BOLDRINI et al., 2008). Apresenta em torno de 400 espécies, com distribuição bastante ampla em regiões tropicais e subtropicais da América (CHASE, 1929; ZULOAGA; MORRONE, 2005). No Brasil estima-se cerca de 210 espécies (FLORA DO BRASIL, 2020, em construção), vivendo em locais de savana, campos, florestas, locais alagados e até mesmo locais arenosos e salinos (DENHAM; ZULOAGA, 2007).

De acordo com Chase (1929), o gênero *Paspalum* é dividido em dois subgêneros e 27 grupos informais, baseado em caracteres morfológicos. Estudos posteriores têm demonstrado que nem todos esses grupos informais são monofiléticos (ESSI; SOUZA-CHIES, 2007), mas diversos grupos ainda têm sido utilizados como referência para os pesquisadores.

Entre as espécies do gênero *Paspalum* ocorre variação morfológica (DENHAM; ZULOAGA, 2007), mas possuem como principal característica em comum as espiguetas abaxiais plano-convexas, sendo essa, provavelmente a sinapomorfia do gênero. As espiguetas se encontram solitárias, ou em par, e as inflorescências são parcialmente racemosas, unilaterais e, geralmente, há ausência da gluma inferior (SOUZA-CHIES et al., 2006; DENHAM; ZULOAGA, 2007; RUA et al., 2010).

A alta variação na poliploidia das espécies destaca-se como uma característica marcante do gênero *Paspalum*. Estudos demonstram que há uma relação estreita entre o nível de ploidia das espécies e o modo de reprodução, observando-se que indivíduos diploides estão relacionados à reprodução sexual e à alogamia, e indivíduos poliploides, associados à apomixia (QUARÍN; BURSON, 1991). Além disso, 60% das espécies desse grupo, já descritas, são apomíticas, sendo que todas estas são poliploides (BRUGNOLI et al., 2013).

O gênero *Paspalum* é um dos principais integrantes da biodiversidade de gramíneas na América do Sul (RUA et al., 2010), e inclui diversas espécies com valor forrageiro. Por isso, planos de melhoramento, conservação e manejo devem ser explorados para as espécies desse grupo. Atualmente, há um crescente interesse para realização de análises moleculares desse gênero, como por exemplo, estudos de variabilidade genética entre populações e relações filogenéticas (SOUZA-CHIES et al., 2006; DENHAM; ZULOAGA, 2007; RUA et al., 2010; SCATAGLINI et al., 2014).

Além disso, trabalhos sobre caracterização citogenética, estudos de fertilidade da planta e análises morfológicas também são realizados para o gênero *Paspalum*, trazendo dados importantes para pesquisas de melhoramento genético, hibridações e poliploidizações de espécies forrageiras (PEREIRA et al., 2012; REIS, 2008).

2.2 *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls

Uma das espécies do gênero *Paspalum* que está ameaçada de extinção é a gramínea campestre *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (Figura 1). Com ocorrência nos três estados da região Sul do Brasil, de acordo com o site *Specieslink*, e com distribuição em regiões de campo de altitude e de campos rupestres (OLIVEIRA; VALLS, 2015). Ainda, pouco se conhece sobre a biologia dessa espécie, que já foi tratada sob o gênero *Thrasypopsis* Parodi, e posteriormente, demonstrou-se que este gênero é filogeneticamente integrado a *Paspalum* (RUA; VALLS, 2012).

Figura 1 - Aspecto geral de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls em campo, no município de Santa Maria, RS.



Fonte: Prof^a Liliana Essi

Das características principais de *P. rawitscheri*, destacam-se inflorescências com raques aladas, cobrindo levemente as espiguetas, racemos normalmente solitários, raramente em pares, antécio inferior masculino e antécio superior bissexual, lâminas foliares fibrosas e longas, com as bainhas apresentando pilosidade pungente e decídua, e espiguetas em pares e glabras (RUA; VALLS, 2012).

Descrição adaptada de BURMAN (1983) para a espécie *P. rawitscheri*: plantas cespitosas, perenes com rizomas curtos. Colmos eretos, moderadamente robustos, glabros com tricomas esparsos, tornando-se pilosos abaixo da inflorescência, com 80 - 140 cm de altura. Nós glabros, bainhas foliares mais longas ou mais curtas que os entrenós, bainhas foliares com tricomas pungentes, caducos com a idade. Lígula membranosa, curta, 3 mm de comprimento, acompanhada de um colar de tricomas. Lâminas foliares planas ou parcialmente conduplicadas, lineares, acuminadas, esparsamente ou densamente hirsutas, com tricomas adpressos à face abaxial, com 15 - 50 cm de comprimento, 8 - 12 mm de largura, as superiores reduzidas, eretas. Sinflorescência com uma panícula de ramos unilaterais espiciformes, terminais, ramos unilaterais solitários, arqueados, de 10 - 15 cm de comprimento. Ráquis amplamente alada, foliácea, até 7 mm de largura (vista dorsal), cobrindo as espiguetas em até 2/3 do comprimento. Espiguetas aos pares, 4,0 - 4,7 mm de comprimento, 1,8 - 2,1 mm de largura, elípticas a elíptico-obovadas. Pedicelos curtos, o superior não excedendo 1,0 mm, com ápice expandindo em um disco membranoso. Gluma 1 membranácea, ocasionalmente nula, sem nervura ou mais desenvolvida, 3 - 5-nervada, gluma 2 um pouco mais curta que o antécio, 13 - 15 (17) - nervada. Antécio inferior masculino, lema 1 desenvolvido, coriáceo, pálea 1 desenvolvida. Antécio superior bissexuado, lema 2 e pálea 2 desenvolvidas. Lodículas de ambos antécios cuneadas, truncadas no ápice. Estames 3, anteras violetas, estiletes 2, estigmas plumosos.

Há poucos estudos de anatomia foliar e filogenia dessa espécie, o que é insuficiente para a compreensão dos processos que estão levando essa espécie à ameaça de extinção. Além disso, não há estudos publicados até o momento sobre o modo de reprodução da espécie, assim como são escassos estudos sobre a fenologia da planta. *P. rawitscheri* é apresentada na lista das espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014) como em perigo (EN) e na lista nacional de espécies ameaçadas (BRASIL, 2014). Há uma grande redução da espécie nas populações registradas (VALLS et al., 2009). Portanto, tornam-se urgentes estudos sobre a espécie que possam auxiliar em planos de conservação.

2.3 Marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

Marcadores moleculares são definidos como sequências de DNA herdáveis geneticamente, através de gerações, e que diferenciam indivíduos da mesma espécie ou de grupos distintos. Eles permitem acesso direto ao genoma do organismo e, assim, evitam a influência do ambiente nos resultados obtidos (MILLACH, 1999).

Diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados para análise de espécies do gênero *Paspalum*. Os marcadores baseados em bandas têm sido considerados mais informativos para estudos de diversidade genética, e destes se destacam os seguintes: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats).

Os marcadores AFLP são baseados na amplificação seletiva de fragmentos de DNA total, por meio da técnica de PCR, sendo a clivagem desses fragmentos feita por enzimas de restrição (VOS et al., 1995).

Os marcadores RAPD amplificam DNA genômico, também por PCR, utilizando *primers* de sequência arbitrária com dez pares de base. Por serem sequências relativamente pequenas, a chance dos *primers* encontrarem fragmentos de diversos tamanhos é grande, ligando-se a diferentes regiões do genoma (LYNCH; MILLIGAN, 1994).

Já os marcadores ISSRs amplificam uma sequência de DNA delimitada por dois SSR (microsatélites) invertidos (BORNET; BRANCHARD, 2004). Os microsatélites são partes constituintes do DNA e suas sequências variam entre um a cinco nucleotídeos repetitivos (HOFFMANN; BARROSO, 2006). Os ISSRs são utilizados para análises genéticas de todos os tipos de organismos (RODRIGUES, 2010). Além de serem muito úteis na identificação de cultivares, possuem níveis de bandas altamente reprodutíveis e abundante polimorfismo, ajudando assim na diferenciação de indivíduos aparentados e em geral, na variabilidade genética de acessos (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

Outras vantagens na utilização de ISSRs são que estes marcadores oferecem rápidas informações sobre diversidade genética de populações e que, comparado a outros marcadores, podem ser feitas análises com equipamentos básicos de biologia molecular em laboratórios, não necessitando de infraestrutura sofisticada (WOLFE; LISTON, 1998).

Vários pesquisadores têm utilizado marcadores ISSRs para avaliação de variabilidade genética entre e dentro de populações do gênero *Paspalum*.

Em trabalho realizado por Brugnoli et al. (2013), que analisaram a diversidade genética, por meio de marcadores ISSRs, de populações diploides e tetraploides de *Paspalum simplex* Morong, foi obtido por amplificação 140 *loci* sendo que 138 eram polimórficos. Cidade et al. (2008), analisaram a variabilidade genética, através de marcadores ISSRs, de 95 acessos de

Paspalum notatum Flüggé da América do Sul. Revelou-se alto polimorfismo entre os acessos, sendo apenas dois segmentos monomórficos (2,2%).

Análises semelhantes foram realizadas por Reyno et al. (2012), os quais avaliaram a variabilidade genética utilizando marcadores ISSRs em 210 indivíduos de *P. notatum* oriundos de localidades do Uruguai. Foram identificados 29 fragmentos polimórficos, sendo que três bandas estavam presentes em 90% dos indivíduos avaliados.

Diante disso, os marcadores ISSRs em estudos de variabilidade genética de gramíneas apresentam boa eficiência, trazendo informações relevantes através da identificação de polimorfismo de espécies (SILVA, A., 2013; ANIMASAUN et al., 2015). Análises de diversidade genética e polimorfismo ajudam a entender de forma mais clara a estrutura populacional de espécies em declínio, auxiliando em planos de conservação e manejo (SANTOS et al., 2007; MENDONÇA, 2011).

2.4 Caracteres citogenéticos: número cromossômico e comportamento meiótico

A citogenética é um campo de estudo que serve como apoio em pesquisas sobre caracterização e conhecimento de espécies, além de auxiliar em estudos de taxonomia. Análises de comportamento meiótico e viabilidade de grãos de pólen são utilizadas em pesquisas no melhoramento genético de plantas (SCHIFINO-WITTMANN, 2009), principalmente em espécies de grande importância econômica por serem utilizadas como pastagens.

Pesquisas vêm sendo realizadas sobre o gênero *Paspalum* devido a seu alto valor forrageiro, ornamental e ecológico. Também características como a alta heterogeneidade interna como apomixia, aloploidia, autoploidia e hibridações entre indivíduos do grupo (HUBER, 2015), fazem com que trabalhos de contagem cromossômica e análises citogenéticas desse gênero sejam importantes, para avaliação dos níveis de ploidia e comportamento cromossômico (ADAMOWSKI et al., 2005; BURTON, 1940; PAGLIARINI et al., 2001, POZZOBON et al., 2008).

Estudo sobre os números cromossômicos em espécies e híbridos de *Paspalum* da região Sul do Brasil foram realizados por Soster (2009), o qual encontrou para *Paspalum dilatatum* Poir. $2n = 60$ cromossomos e para *Paspalum urvillei* Steud. $2n = 40$ cromossomos. Assim, os pareamentos cromossômicos em espécies do gênero *Paspalum* variam entre univalentes, bivalentes, trivalentes e quadrivalentes, sendo que tetraploides apresentam, principalmente, configurações cromossômicas bivalentes (ADAMOWSKI et al., 2005).

Em pesquisa realizada por Santos (2013), todos os acessos analisados da espécie *Paspalum atratum* Swallen apresentaram-se tetraploides ($2n = 40$). A maior parte das associações cromossômicas encontradas foram uni e tetravalentes. Apenas dois acessos apresentaram configurações atípicas, hexa, hepta, octa, decta e undecavalentes. A autora relacionou essas associações diferenciadas à ocorrência de translocação heterozigótica.

Apesar de já terem sido analisados os números cromossômicos de diferentes espécies do gênero *Paspalum*, não foram encontrados registros para a espécie *P. rawitscheri*.

2.5 Medidas estomáticas, diâmetro do grão de pólen e poliploidia

A poliploidia pode causar alterações fenotípicas nos organismos (SILVA, P., 2014), análises de caracteres morfológicos são utilizadas para inferir diferenças entre indivíduos com níveis de ploidia distintos, como análise do tamanho dos estômatos e diâmetro de grãos de pólen (SOUZA; QUEIROZ, 2004; TEDESCO et al., 1999; VICHATO et al., 2006).

A avaliação do tamanho estomático é um método simples de ser realizado, podendo inferir diferenças entre poliploides, pois a variação do diâmetro dos estômatos pode ocorrer pelo aumento do número cromossômico (VICHATO et al., 2006). Ainda, a diferença no conteúdo genético celular de plantas pode ocasionar a geração de indivíduos poliploides, aneuploides e euploides. Essa diferença genética pode estar relacionada à citomixia e a grãos de pólen de tamanhos distintos (DIEGUES et al., 2015).

Ao avaliar a morfologia foliar de acessos, com diferentes níveis de ploidia, de *Citrus clementina* hort., Padoan et al. (2013), demonstraram que os indivíduos triploides apresentaram estômatos maiores e mais longos do que os diploides. Em pesquisa de Silva (2012) novamente se confirmou a relação do tamanho estomático com o nível de ploidia em *Musa acuminata* Colla, com acessos tetraploides apresentando estômatos maiores, mas em quantidades menores, quando comparado aos indivíduos diploides. Esse tipo de informação traz importantes dados que podem ser utilizados em pesquisas de melhoramento por duplicação para a verificação de poliploides.

Quando analisado o tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen de *Eriotheca gracilipes* (K. Schum.) A. Robyns e *Eriotheca pubescens* (Mart. & Zucc.) Schott & Endl., Marinho (2013) relatou que houve diferença significativa entre as medidas dos estômatos e polens quando comparados acessos das duas espécies. Em geral, os citotipos hexaploides apresentaram medidas maiores do que os citotipos tetraploides e diploides. O tamanho dos grãos de pólen de *E. pubescens* foram maiores do que os de *E. gracilipes*, ocorrendo o contrário para os tamanhos

dos estômatos, onde *E. gracilipes* apresentou estômatos maiores quando comparado a *E. pubescens*.

Para o gênero *Paspalum*, avaliou-se o tamanho estomático de acessos diploides e tetraploides de *Paspalum glaucescens* Hack., oriundos do Sul do Brasil, demonstrando que os citotipos tetraploides apresentaram tamanho médio estomático maior do que os diploides (POZZOBON; VALLS, 2000). Em contrapartida, Vieira (2014) demonstrou resultado diferente. Analisando a diferença de largura do complexo estomático entre acessos de *Paspalum stellatum* Humb. & Bonpl. ex Flügge de diferentes regiões do Brasil. Um acesso *P. stellatum* ($2n = 52$) apresentou estômatos mais largos quando comparado a *P. stellatum* ($2n = 60$), contrariando a ideia de que citotipos com estômatos maiores devem apresentar nível de ploidia maior.

No gênero *Paspalum* a avaliação do tamanho estomático pode ser um parâmetro interessante para avaliar os níveis de ploidia, pois apresenta poliplodia variável entre as espécies, podendo ocorrer diferença significativa no diâmetro estomático e também de grãos de pólen.

2.6 Caracterização da viabilidade polínica

A viabilidade dos grãos de pólen apresenta informações importantes sobre a fertilidade da espécie. Além disso, pode-se determinar a eficiência da planta em cruzamentos através da análise dos polens viáveis e/ou inviáveis (DIEGUES et al., 2015). A boa fertilidade de uma planta se dá pela formação de gametas normais e balanceados (MARTINS et al., 2010) e pode ser avaliada por meio de germinação *in vitro* (SILVA et al., 2017), *in vivo* (DAVIDE et al., 2009) e também por métodos colorimétricos (HISTER; TEDESCO, 2016).

O método de coloração para estimar a viabilidade polínica é considerado uma técnica barata e com rápida obtenção de resultados. Nesse método relaciona-se a viabilidade com a coloração, relacionando os polens abortados e não abortados que se demonstram não corados e corados, respectivamente (ALVIM, 2008). Além disso, os grãos de pólen viáveis devem apresentar a exina íntegra, com protoplasma bem corado e bem distribuído, e os inviáveis coloração fraca ou sem coloração, protoplasma reduzido e tamanho anormal (RUCHEL et al., 2015).

Para avaliação da viabilidade dos grãos de pólen podem ser utilizados diferentes métodos colorimétricos como o corante orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Quando utilizado o corante orceína acética 2%, os grãos de pólen viáveis

apresentam coloração vermelha, já os inviáveis apresentam a mesma cor, mas com intensidade mais fraca (PAULA, 2009). Desta maneira, esse método de coloração pode superestimar a viabilidade polínica, dificultando a distinção entre os polens viáveis e inviáveis (FRESCURA et al., 2012).

O corante carmim acético cora os grãos de pólen viáveis de rosa forte, já os polens estéreis não apresentam coloração, dessa forma, torna-se mais fácil distingui-los (PAGLIARINI; POZZOBON, 2004).

Com a utilização do reativo de Alexander há uma facilidade maior em distinguir os grãos de pólen viáveis dos inviáveis, pois esse corante apresenta na sua constituição fucsina ácida e verde de malaquita que reagem, respectivamente, com o protoplasma e a celulose da parede do grão de pólen (MUNHOZ et al., 2008). Assim, nos grãos de pólen viáveis o protoplasma apresenta coloração púrpura e a parede celular verde e, nos inviáveis, tanto o protoplasma, que pode ser reduzido ou ausente, quanto a parede coram-se de verde (ALEXANDER, 1980; HISTER; TEDESCO, 2016).

Alguns estudos de viabilidade polínica foram realizados no gênero *Paspalum* demonstrando a porcentagem de viabilidade. Em pesquisa de Balbinot (2007) mostrou-se que 64 acessos de *P. notatum* apresentaram alta viabilidade, variando de 72,40% a 98%. Em trabalho realizado por Krycki (2015), que analisou três plantas de *P. notatum* oriundas de duplicação cromossômica de um acesso diploide de *P. notatum* (cv. Pensacola), demonstrou-se a viabilidade variando de 88,7% a 95,7%, apresentando boa fertilidade.

Há casos em que as plantas apresentam baixa viabilidade polínica, onde vários fatores podem influenciar, como por exemplo, temperatura, umidade e até mesmo longevidade da flor (ARENAS-DE-SOUZA et al., 2014). Demonstrando assim, que dentro de uma mesma espécie pode ocorrer diferença na viabilidade polínica entre indivíduos, através da diferença de habitats em que esses indivíduos estão inseridos.

Em estudo realizado por Kuhn (2015) foi avaliada a diferença da viabilidade polínica de *Peltodon longipes* A. St.-Hil. ex Benth., provenientes de distintas localidades, utilizando os corantes:orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. A análise com corante carmim acético 2% foi a que apresentou a maior diferença significativa da viabilidade polínica entre os acessos, variando de 57,5% a 99,12%. Assim, demonstra-se a diferença da viabilidade entre indivíduos de uma mesma espécie inseridos em diferentes localidades.

A baixa viabilidade polínica e a formação dos grãos de pólen anormais são problemas enfrentados por espécies em declínio ou ameaçadas de extinção. Ao analisar a germinação *in vitro* dos grãos de pólen da espécie ameaçada *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih, Jian et

al. (2009) demonstraram que a taxa de viabilidade para essa planta é muito baixa, aproximadamente 10%. Os autores relacionaram o declínio da espécie à baixa capacidade reprodutiva e à fraca viabilidade dos grãos de pólen.

Já em pesquisa realizada por Zhao e Sun (2009) demonstrou-se que *Michelia coriacea* H.T. Chang & B.L. Chen, uma espécie criticamente ameaçada, apresenta uma taxa de polens anormais de 60% e 70% de óvulos com atraso no desenvolvimento. Relacionando, em partes, a redução contínua da espécie às anormalidades encontradas nos grãos de pólen e nos óvulos, além da baixa produção de sementes causada pela endogamia.

Diante disso, a fertilidade de uma espécie pode ter relação direta com o aumento ou diminuição de uma população. A análise da viabilidade polínica de espécies ameaçadas é essencial, pois auxilia na compreensão do modo de reprodução, além de contribuir para práticas de conservação genética e melhoramento vegetal (OLIVEIRA, 2012; SANTOS et al., 2015).

3 ARTIGO 1 ¹

Diversidade genética de populações naturais de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (Paspalae, Poaceae) do Rio Grande do Sul

Genetic diversity of natural populations of *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (Paspalae, Poaceae) of Rio Grande do Sul

Jéssica Mena Barreto de Freitas ^{a,*}, Liliana Essi ^b, Solange Bosio Tedesco ^b

^a Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. * Autor para correspondência. E-mail: jessicamenabarretofreitas@gmail.com

^b Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

O gênero *Paspalum* apresenta diversas espécies com grande valor econômico e forrageiro, mas, dentro desse grupo, há espécies que estão em declínio e encontram-se em listas de espécies ameaçadas como é o caso de *Paspalum rawitscheri*. Há poucas informações sobre a biologia dessa espécie e suas populações estão sendo progressivamente reduzidas, tornando-se urgente estudos sobre a estrutura populacional e diversidade genética dessa planta. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de populações naturais de *P. rawitscheri* através de marcadores ISSRs (Inter Simple Sequence Repeat), visando uma compreensão mais clara sobre a sua biologia. Foram avaliadas a diversidade genética e a estrutura populacional de quatro populações de *P. rawitscheri* do RS: Santa Maria, São Martinho da Serra, Campestre da Serra e Vacaria, utilizando-se seis *primers* diferentes. Foi amplificado um total de 131 fragmentos, sendo 34 polimórficos. As bandas apresentaram tamanho variado entre 250 e 5000 pb. A diversidade genética (*h*) para as populações foi considerada baixa, apresentando valores entre 0,130 e 0,217, sendo a população de Vacaria a que demonstrou a menor diversidade entre as populações avaliadas. Os índices de diversidade de Shannon (*I*) também se apresentaram baixos para todas as populações avaliadas, com valores entre 0,187 e 0,334, novamente a população de Vacaria apresentou o menor valor. Quando avaliada a variância molecular (AMOVA) observou-se que para todos os marcadores analisados, a variação mais alta ocorreu dentro das populações do que entre populações. A análise Bayesiana separou os indivíduos em quatro clusters, mas com uma mistura de indivíduos, de localidades distintas, nos agrupamentos. Os resultados apontam que a espécie apresenta baixa diversidade genética e baixa estrutura populacional, sendo necessários planos de conservação para essa espécie. Como as populações dessa espécie encontram-se em locais com resquícios de queimadas e com degradação antrópica, a conservação *ex situ* torna-se uma alternativa a considerar. Com o resgate de exemplares de ambientes sob risco iminente de degradação e estímulo de criação de áreas protegidas onde a espécie ocorre, essa planta teria uma maior chance de sobrevivência e possível aumento do número de indivíduos nas populações.

¹ Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista Biochemical Systematics and Ecology.

Palavras-chave: gramínea campestre, estrutura populacional, campos sulinos, conservação.

ABSTRACT

The genus *Paspalum* presents several species with great economic and forage value, however within this group, there are species that are in decline and are on lists of endangered species, as is the case of *Paspalum rawitscheri*. There is little information on the biology of this species and its populations are being progressively reduced, and studies on the population structure and genetic diversity of this plant are urgently needed. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity of natural populations of *P. rawitscheri* through ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers, aiming at a clearer understanding of their biology. The genetic diversity and the population structure of four *P. rawitscheri* populations of RS were evaluated: Santa Maria, São Martinho da Serra, Campestre da Serra and Vacaria, using six different primers. A total of 131 fragments were amplified, being 34 polymorphic. The bands varied in size from 250 to 5000 bp. The genetic diversity (h) for the populations was considered low, presenting values between 0.130 and 0.217, and the Vacaria population showed the lowest diversity among the evaluated populations. The diversity indexes of Shannon (I) were also low for all populations evaluated, with values between 0,187 and 0,334, again the Vacaria population had the lowest value. When the molecular variance (AMOVA) was evaluated, it was observed that for all the analyzed markers, the highest variation occurred within populations than among populations. Bayesian analysis separated the individuals into four clusters but with a mixture of individuals from distinct locations in the clusters. The results indicate that the species presents low genetic diversity and low population structure, being necessary conservation plans for this species. As the populations of this species are found in places with burning remnants and with anthropic degradation, ex situ conservation becomes an alternative. With the rescue of specimens of environments under imminent risk of degradation and stimulation of creation of protected areas where the species occurs, this plant would have a greater chance of survival and possible increase of the number of individuals in the populations.

Key-words: grassland, population structure, southern grasslands, conservation.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Paspalum*, pertencente à família Poaceae, apresenta em torno de 400 espécies com distribuição ampla, desde regiões tropicais até subtropicais da América (Oliveira; Valls, 2002; Zuloaga; Morrone, 2005). Além disso, essas espécies são encontradas em diferentes tipos de habitats como savanas, florestas, locais salinos, locais secos e alagados (Denham; Zuloaga, 2007). Algumas das principais características morfológicas desse grupo são inflorescências unilaterais, espiguetas plano-convexas, em pares ou solitárias, parcialmente racemosas e, normalmente, gluma inferior ausente (Souza-Chies et al., 2006; Rua et al., 2010).

Algumas espécies do gênero *Paspalum* apresentam alto potencial forrageiro e grande importância econômica e agrônômica (Batista; Godoy, 2000), principalmente na região Sul do Brasil. Pesquisas sobre melhoramento genético e hibridizações são realizadas em plantas deste grupo, visando produzir uma pastagem de alta qualidade e resistente a pragas do campo (Pereira, 2013; Motta et al., 2016). Desta maneira, esse grupo contribui expressivamente para a biodiversidade de gramíneas sul-riograndenses, sendo um importante objeto de estudo em pesquisas com enfoque na caracterização de germoplasma, em análises sobre diversidade genética e de estrutura de populações e, também, em pesquisas de melhoramento genético de plantas (Batista; Godoy, 2000; Sawasato et al., 2008; Pereira et al., 2012).

Nos últimos anos, pesquisas estão sendo realizadas com o enfoque no estudo da estrutura populacional de espécies do gênero *Paspalum* utilizando marcadores moleculares, como o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Cidade et al., 2008; Reyno et al., 2012). Os marcadores ISSRs são utilizados para análises genéticas de todos os tipos de organismos (Rodrigues, 2010). Possuem níveis de bandas altamente reprodutíveis e abundante polimorfismo, diferenciando indivíduos aparentados e também avaliando a variabilidade genética de acessos (Zietkiewicz et al., 1994). Esse tipo de marcador também fornece informações rápidas sobre a diversidade genética de populações, comparado a outros métodos, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma das espécies. Os estudos populacionais com marcadores moleculares são particularmente importantes, principalmente em se tratando de espécies que estejam com algum grau de ameaça de extinção.

Poaceae é uma das dez famílias de angiospermas da flora brasileira com maior número de espécies ameaçadas de extinção (Martinelli; Moraes, 2013). Há espécies pertencentes ao gênero *Paspalum* que se encontram com alta redução populacional as quais são consideradas ameaçadas. É o caso da espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, que se encontra na lista das espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2014) como em perigo (EN) e na lista nacional de espécies ameaçadas (Brasil, 2014).

Paspalum rawitscheri ocorre na região Sul do Brasil e distribui-se em regiões de campos de altitude e de campos rupestres (Oliveira; Valls, 2015) dos Biomas Pampa e Mata Atlântica. As características morfológicas mais marcantes desta planta são as inflorescências com raque alada, lâminas foliares fibrosas e longas, com as bainhas apresentando pilosidade pungente e decídua, e espiguetas glabras e emparelhadas (Rua; Valls, 2012). Como há poucas informações sobre essa espécie, torna-se urgente a avaliação genética dessa planta através de estudos de variabilidade genética e estrutura populacional.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade genética de populações naturais de *P. rawitscheri*, através de marcadores ISSRs, visando a compreensão sobre a biologia da espécie. E, assim, podendo trazer informações relevantes que possam ajudar em estudos de conservação dessa planta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material botânico

O material botânico utilizado para a realização deste trabalho foi obtido através de coletas a campo no sul do Brasil, nos locais previamente registrados conforme indicações de exsicatas localizadas através do *site* Specieslink (CEN, ICN e SMDB) e literatura. Foram realizadas coletas nos municípios de Campestre da Serra, Santa Maria, São Martinho da Serra e Vacaria, no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1 e Figura 1), cujo material- testemunho foi depositado no herbário SMDB do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Para a extração de DNA vegetal, foram coletadas folhas frescas de 5-45 indivíduos por população, e preservadas em sílica gel para posterior processamento em laboratório. O número de indivíduos coletados variou devido aos diferentes tamanhos das populações localizadas.

Tabela 1 Lista de acessos da espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls utilizados no estudo.

Número do Coletor	N	Município	Latitude	Longitude	Altitude (m)
749	7	Santa Maria	29°37'37,5"S	053°52'27,1"W	222
757	7	Santa Maria	29°37'51,3"S	053°52'30,7"W	222
799	10	Santa Maria	29°37'52,53"S	53°52'32,35"W	268
1049	18	São Martinho da Serra	29°24'54,8"S	054°01'09,6"W	311
1053	8	São Martinho da Serra	29°24'53,4"S	054°01'07,1"W	305
766	46	Campestre da Serra	28°40'42,7"S	051°03'50,3"W	770
769	9	Vacaria	28°08'15,9"S	050°53'54,5"W	869

N=número de indivíduos por população

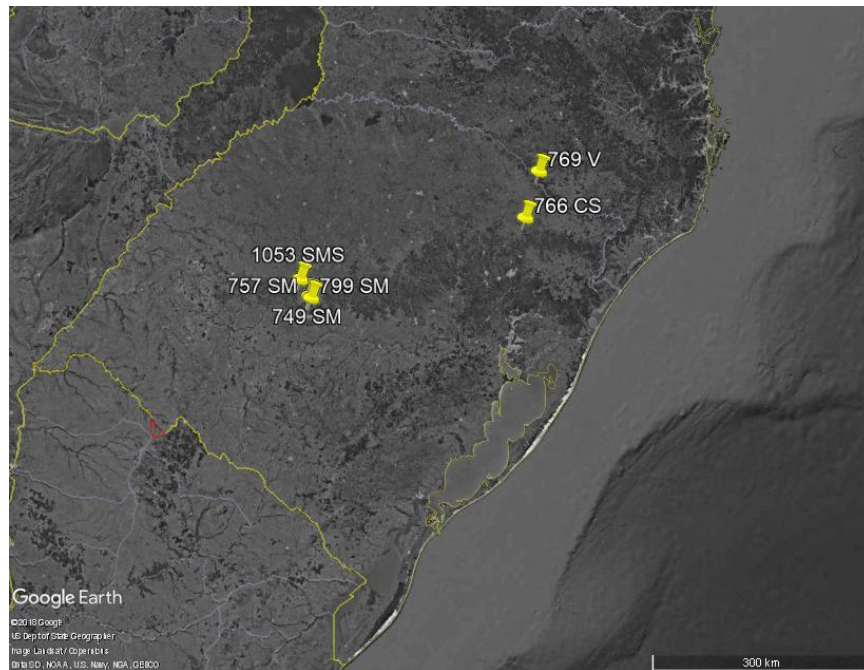


Figura 1 Distribuição geográfica das populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls do Rio Grande do Sul utilizadas nesse estudo. SM - Santa Maria; SMS - São Martinho da Serra; CS - Campestre da Serra; V- Vacaria.

2.2. Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a extração de DNA, foi utilizado material preservado em sílica gel, conforme descrito na seção anterior. Foi extraído DNA total através do método CTAB (Doyle; Doyle, 1987) adaptado para tubos de microcentrífuga. O DNA isolado foi dosado através de gel de agarose 0,8% corado com *Gel Red*, por comparação com DNA-padrão (lambda).

Para a amplificação por PCR foi utilizado um volume final total de 25µl contendo 1µl de DNA genômico total (entre 20 e 50ng/µl); 2,5 µl de tampão (Buffer 10X); 2,3µl de MgCl₂ (50 mM); 1µl de primer; 1µl de dNTP; 1µl de DMSO; 0,25µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl e H₂O ultra pura para completar os 25µl. A amplificação do DNA foi realizada no termociclador (Minicicler™) com os seguintes ciclos: passo inicial de 94°C por 5 minutos (desnaturação); 40 ciclos a 94°C por 45s; 58°C por 1 min (anelamento); 72°C por 1,5 minutos e extensão final a 72° por 10 minutos. Para esse estudo, foram utilizados seis diferentes *primers* (Tabela 2), escolhidos entre os 11 testados. Esses seis *primers* foram selecionados por apresentarem

amplificação em maior número de amostras testadas, com polimorfismo de bandas, bem como estabilidade de amplificação.

Tabela 2 Lista de *primers* utilizados no estudo de variabilidade genética da espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.

<i>Primer</i>	Sequência do <i>primer</i>
F4	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
i.5	AGAGAGAGAGAGAGAGTA
O4	ACACACACACACACACC
P3	CTCCTCCTCCTCRC
P4	CTCTCTCTCTCTCTG
P7	CTCTCTCTCTCTCTT

Os produtos de PCR obtidos foram separados em gel de agarose 1,5% TBE buffer 0,5X em 100V por 2h e corados com *Gel Red*. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador molecular de 100 pb e 1 kb DNA Ladder. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotografados.

Os fragmentos amplificados para cada *primer* foram tratados como marcadores dominantes e foram avaliados como presença (1) e ausência (0) de banda. A partir dos padrões de bandas obtidos através da técnica de ISSR, avaliou-se parâmetros genéticos como estrutura das populações, conteúdo de polimorfismo, diversidade genética e número efetivo de populações.

2.2. Análise estatística

Para os resultados de cada *primer* foram elaboradas matrizes binárias de presença (1) e ausência (0) de bandas para as análises. A porcentagem de *loci* polimórficos (P), o índice de diversidade genética de Shannon (*I*), diversidade genética (*h*), número de alelos diferentes (*N_a*), número efetivo de alelos (*N_e*) e número de bandas privadas para cada população foram

analisados utilizando o software GenAlEx 6.5 (Peakall; Smouse, 2012), juntamente foi feita a análise de variância molecular (AMOVA).

Foram calculadas as médias dos valores de diversidade genética descritos acima para cada população estudada. E a inferência Bayesiana de agrupamento (K) foi realizada com os softwares STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) e STRUCTURE Harvester (Earl e vonHoldt, 2012), em matriz unificada de todos os *primers*.

3. RESULTADOS

3.1. Diversidade genética e estrutura das populações

A diversidade genética de 72 indivíduos de *P. rawitscheri* foi analisada por meio de marcadores ISSRs. Os seis *primers* ISSR utilizados permitiram a obtenção de 131 fragmentos, sendo 34 polimórficos. O número de bandas variou entre 16 e 26, com uma média de 21,4 por *primer* e o tamanho das bandas variou de 250 a 5000 pb.

O percentual de polimorfismo apresentou grande variação conforme o local de coleta, com valores baixos (29,28%), para a população de Vacaria, e altos (67,48%) para a população de Campestre da Serra (Tabela 3). Das quatro populações avaliadas, Campestre da Serra teve a maior diversidade genética ($h = 0,217$) e o maior índice de diversidade de Shannon ($I = 0,334$) e Vacaria apresentou os menores valores para diversidade genética e diversidade de Shannon ($h = 0,130$ e $I = 0,187$). (Tabela 3). Essa diferença pode estar relacionada não só com a diferenciação entre indivíduos, mas também com a grande diferença de tamanho populacional, que influenciou no tamanho amostral.

Tabela 3 Médias calculadas para os índices de diversidade genética.

População	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	50,22	1,005	1,329	0,284	0,192
São Martinho da Serra	54,40	1,086	1,312	0,282	0,187
Campestre da Serra	67,48	1,350	1,366	0,334	0,217
Vacaria	29,28	0,605	1,234	0,187	0,130

*P (porcentagem de *loci* polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

Quando comparadas as populações de Santa Maria e São Martinho da Serra, notou-se que os índices de diversidade genética apresentaram valores parecidos, $h = 0,192$ e $h = 0,187$, respectivamente. Essas duas populações não apresentaram uma grande diferença entre os valores de diversidade, isso pode ser explicado pelo fato de Santa Maria e São Martinho da Serra serem municípios vizinhos, com pequena distância geográfica, apresentando provavelmente semelhanças genéticas entre os indivíduos.

Quando realizada uma AMOVA para a partição da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações, observou-se que, para os padrões de todos os *primers*, a variação mais alta ocorreu dentro das populações do que entre as populações (Tabela 4). Os valores dentro das populações variaram de 89% a 98%, e entre populações ocorreram valores muito reduzidos, entre 2% e 11%, demonstrando assim que a estrutura das populações não é alta, havendo diferenciação significativamente maior entre os indivíduos do que entre localidades distintas.

A inferência Bayesiana de agrupamento realizada pelo STRUCTURE e STRUCTURE Harvester revelou $K = 4$ (Figura 2), com uma grande mistura genética entre as populações nos clusters (Figura 3). Nos grupos genéticos, apresentados na Figura 2, há a presença de indivíduos de todas as localidades do RS, dificultando a distinção entre populações. Apenas observa-se que nos grupos genéticos com predominância de coloração azul e amarelo há uma maior frequência de indivíduos de Campestre da Serra. O grupo de coloração predominante verde apresenta um número considerável de indivíduos da população de São Martinho da Serra, já os indivíduos de Santa Maria e Vacaria estão espalhados pelos grupos genéticos.

Esses resultados mostram que não há uma estruturação populacional forte para a espécie *P. rawitscheri*, havendo baixa diversidade genética. Ao mesmo tempo, a formação de 4 clusters distintos revela que não há uma homogeneidade na diversidade genética dos indivíduos das diferentes localidades do estado. Os clusters apresentaram uma mistura entre indivíduos, onde as populações efetivas apresentadas não estão completamente correspondentes às localidades no RS onde foi encontrada a espécie.

Tabela 4 Quadro de análise da variância molecular (AMOVA) para quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls com dados de seis *primers* ISSR.

<i>Primer</i>	Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Varição (%)	p valor
F4	Entre as populações	3	8,929	0,151	6	0,061
	Dentro das populações	14	32,571	2,327	94	0,061
	Total	17	41,500	2,478	100	
i.5	Entre as populações	2	6,497	0,062	2	0,023
	Dentro das populações	25	67,003	2,680	98	0,023
	Total	27	73,500	2,742	100	
O4	Entre as populações	2	7,712	0,152	6	0,056
	Dentro das populações	26	66,150	2,544	94	0,056
	Total	28	73,862	2,696	100	
P3	Entre as populações	3	12,736	0,116	3	0,034
	Dentro das populações	35	114,238	3,264	97	0,034
	Total	38	126,974	3,379	100	
P4	Entre as populações	2	8,067	0,278	11	0,113
	Dentro das populações	23	50,241	2,184	89	0,113
	Total	25	58,308	2,462	100	
P7	Entre as populações	2	9,050	0,306	10	0,105
	Dentro das populações	17	44,400	2,612	90	0,105
	Total	19	53,450	2,918	100	

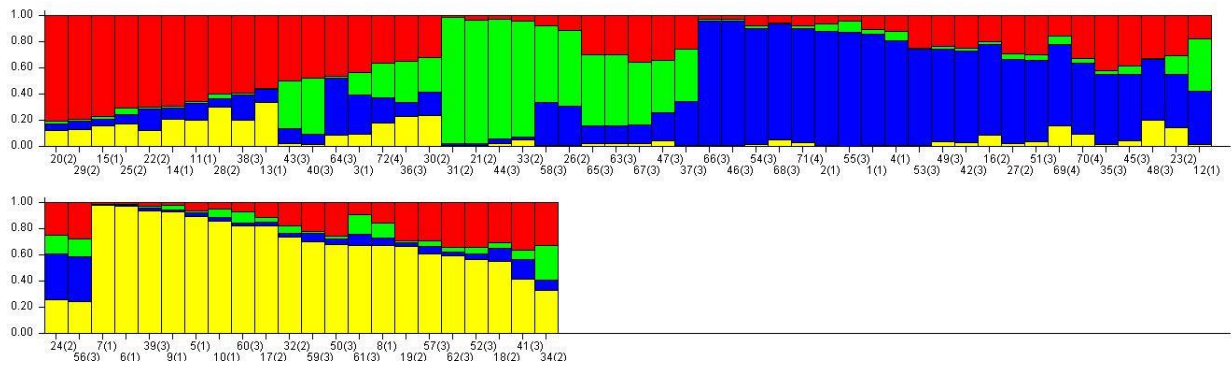


Figura 2 Representação em gráfico de barras da análise Bayesiana do agrupamento genético entre populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls obtidas pelo programa STRUCTURE (K = 4). População 1 – Santa Maria; População 2 – São Martinho da Serra; População 3 – Campestre da Serra; População 4 – Vacaria.

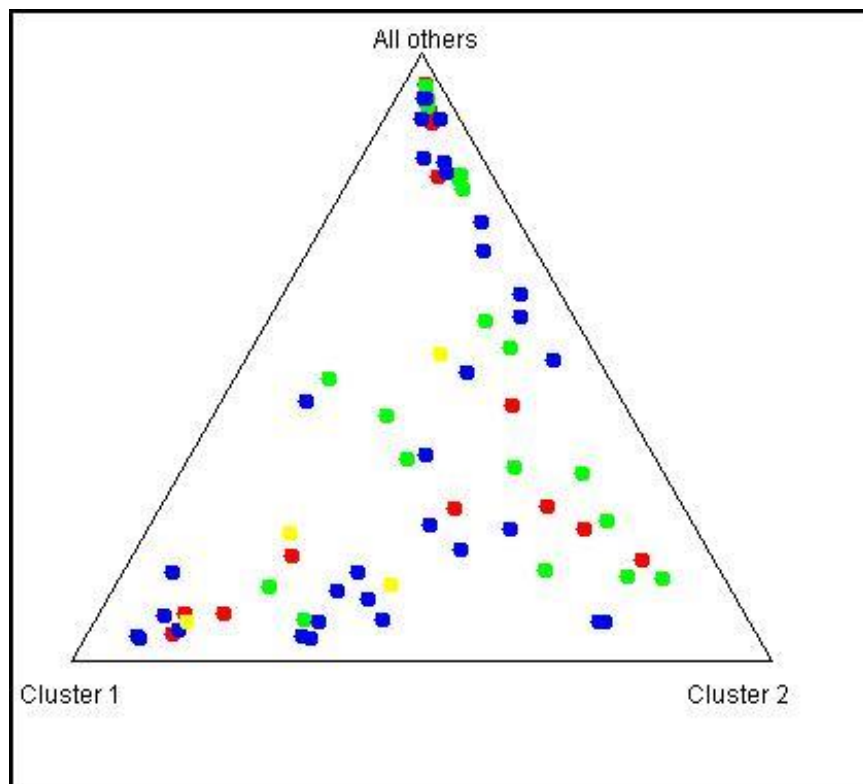


Figura 3 Distribuição em clusters dos indivíduos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls obtida pelo programa STRUCTURE.

4. DISCUSSÃO

4.1. Diversidade genética e estrutura das populações

O uso de marcadores moleculares ISSR serve como uma ferramenta bastante útil na avaliação de diversidade genética, estrutura populacional e relação filogenética do gênero *Paspalum*, como observado também por outros autores em estudos similares (Zilli et al., 2014; Singh, 2016).

As médias de *loci* polimórficos para as populações de *P. rawitscheri* apresentaram-se bastante variadas. O maior percentual foi de 67,48% para a população de Campestre da Serra. Dos 131 fragmentos obtidos, apenas 34 eram polimórficos. Quando analisado o polimorfismo, por marcadores ISSR, para a espécie em risco *Oryza granulata* Nees et Am. ex Watt., da Ásia, foi encontrado resultado semelhante. A taxa de polimorfismo, entre 14 populações de *O. granulata* analisadas, foi de 64% e, dos 114 fragmentos amplificados nesse estudo, 73 eram polimórficos (Wu et al., 2004).

Em contrapartida, quando analisado o polimorfismo de 95 acessos de *Paspalum notatum* Flügge oriundos da América do Sul, as médias de *loci* polimórficos apresentaram-se elevadas, entre 100 e 94,4%. Dos 94 fragmentos amplificados, 84 eram polimórficos (Cidade et al., 2008). Esse resultado pode ser explicado pelo fato da espécie *P. notatum* ser comum e amplamente utilizada em cultivo para pastagem de animais em campo e assim, não apresenta risco de redução populacional.

No presente estudo, as médias dos índices de diversidade genética para a espécie ameaçada de extinção *P. rawitscheri* foram baixos: o índice de Shannon (*I*) variou entre 0,187 e 0,334 e a diversidade genética (*h*) variou de 0,130 a 0,217. O mesmo ocorreu para a espécie *Paspalum scrobiculatum* L., que apresentou valores entre 0,08 e 0,28 para diversidade genética (*h*) e 0,04 e 0,37 para índice de Shannon (*I*) (Yadav et al., 2016). Essa baixa diversidade genética pode estar relacionada ao tamanho populacional reduzido, tornando os indivíduos muito similares e assim, correndo o risco de não sobreviverem às adversidades do ambiente.

Quando analisada a variância molecular (AMOVA) para a espécie *P. rawitscheri* nota-se uma variação muito maior dentro das populações do que entre as localidades, o que era esperado pela baixa estrutura populacional que essa espécie apresenta. Resultado semelhante foi apresentado para orquídea estadunidense ameaçada, *Piperia yadonii* Rand. Morgan & Ackerman (George et al., 2009), onde os autores avaliaram a estrutura populacional por AMOVA em dois períodos diferentes, 2006 e 2007, e tiveram como resultado que aproximadamente 40% do total de variação foi entre populações e 60% foi atribuído para diferenças entre indivíduos dentro das populações.

A distinção entre populações não se dá apenas por fatores genéticos, mas também está relacionada com diferenças climáticas, fatores ecológicos, e diferenciação de solo e de clima (Reisch et al., 2003; Valle et al., 2013).

Em contrapartida, Alam et al. (2008), em análises de diversidade genética de populações da espécie ameaçada *Podophyllum hexandrum* Royle, nativa do Himalaia, apresentaram resultados diferentes. Os autores, por meio de análises com ISSR, verificaram que essa espécie apresentava níveis de diversidade altos entre populações e que tais variações (48%) eram maiores do que dentro das populações (23%), e ainda que as populações da mesma divisão florestal apresentaram maior diversidade genética, indicando que o fluxo gênico ocorreu principalmente entre populações inseridas nas mesmas divisões florestais.

2.2. Implicações para conservação

Os marcadores ISSRs são muito utilizados em análises de diversidade genética e estrutura populacional, servindo como apoio para planos de conservação de espécies em declínio (Liu et al., 2013; Rodrigues et al., 2013). Na biologia da conservação, a diversidade genética é um fator crucial, devendo ser mantida e priorizada para futuras gerações. Embora haja diversos estudos publicados sobre diversidade genética de plantas ameaçadas, raros são os estudos disponíveis para plantas brasileiras (Pinheiro et al., 2012; Ribeiro et al., 2013). Esta lacuna representa uma dificuldade importante no momento de definir estratégias de conservação das espécies de plantas ameaçadas de extinção no Brasil.

A espécie *P. rawitscheri* apresenta alguns fatores que levam ao declínio das populações como: (1) as populações estão inseridas em locais que apresentam resquícios de queimadas e/ou de degradação de origem antrópica; (2) a espécie não se encontra em unidades de conservação no RS (Ribeiro et al., 2018); (3) as populações apresentam baixa diversidade genética e não há estrutura populacional bem definida.

Zhang et al. (2005), quando avaliaram a diversidade genética de *Pinus squamata* X.W. Li, relacionaram a baixa variação genética a processos evolutivos do passado e perdas recentes de indivíduos nas populações causadas pela ação humana. Ainda de acordo com os mesmos autores, a conservação de subpopulações *in situ*, para espécies com tamanho populacional reduzido, é extremamente necessária para preservação da variação genética.

Além disso, é muito mais interessante e satisfatório a conservação de populações, que unidas maximizam a diversidade genética de um determinado grupo ou espécie, do que

populações que apresentam diversidade única e individual, formando grupos isolados (Rodrigues et al., 2013).

Segundo Liu et al. (2013) a conservação *ex situ* torna-se interessante para espécies ameaçadas e deve ser unida à conservação *in situ*, por meio de propagação de sementes para o estabelecimento de novas gerações tanto em cultivo como em ambiente natural.

Em conclusão, como foi detectada uma baixa diversidade genética para as pequenas populações de *P. rawitscheri* no RS, é de extrema urgência a conservação dessa espécie. A conservação *ex situ* torna-se importante visto que as populações naturais estão inseridas em locais de risco iminente de degradação, como beiras de estrada e áreas de instalação de empreendimentos hidrelétricos, sendo, então a tentativa de cultivo em diferentes habitats e locais de proteção, uma alternativa relevante e que poderá trazer resultados positivos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, e ao Departamento de Biologia da UFSM pelo auxílio financeiro para expedições de coleta. Também agradecem a Prof^a Dr^a Zaida Ines Antoniulli por propiciar o uso de estrutura laboratorial.

REFERÊNCIAS

- Alam, A., Naik1, P.K., Gulati, P., Gulati, A.K., Mishra, G.P. 2008. Characterization of genetic structure of *Podophyllum hexandrum* populations, an endangered medicinal herb of Northwestern Himalaya, using ISSR-PCR markers and its relatedness with podophyllotoxin content. African Journal of Biotechnology. 7, 8, 1028-1040. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58599> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Batista, L.A.R., Godoy, R. 2000. Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para a produção de forragem. Revista Brasileira de Zootecnia. 29, 1, 23-32. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000100004>. (Acessado 17 dezembro 2018).
- Brasil, 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. Brasília, Decreto 6.101. http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf (Acessado 05 dezembro 2018)
- Cidade, F.W., Dall’Agnol, M., Bered, F., Souza-Chies, T.T. 2008. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüge (Paniceae: Panicoideae). Genetic Resources and Crop Evolution. 55, 235-246. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9231-8> (Acessado 17 dezembro 2018).

- Denham, S.S., Zuloaga, F.O. 2007. Phylogenetic Relationships of the Decumbentes Group of *Paspalum*, *Thrasya*, and *Thrasypopsis* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). *Journal of Systematic and Evolutionary Botany*. 23, 1, 545-562. <https://doi.org/10.5642/aliso.20072301.41> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19, 11-15. https://www.researchgate.net/publication/245035737_A_Rapid_DNA_Isolation_Procedure_from_Small_Quantities_of_Fresh_Leaf_Tissues (Acessado 18 dezembro 2018).
- Earl, D.A., von Holdt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4, 2, 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7> (Acessado 12 janeiro 2018).
- George, S., Sharma, J., Yadon, V.L. 2009. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany*. 96, 11, 2022-2030. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800368> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Liu, J., Shi, S., Chang, E., Yang, W., Jiang, Z. 2013. Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. *International Journal of Molecular Sciences*. 14, 14860-14871. <https://doi.org/10.3390/ijms140714860> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Martinelli, G., Moraes, M.A. 2013. Livro Vermelho da Flora do Brasil., 1 ed. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 1100. <http://dspace.jbrj.gov.br/jspui/handle/doc/26> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Motta, E.A.M., Dall'Agnol, M., Nascimento, F.L., Pereira, E.A., Machado, J.M., Barbosa, M.R., Simioni, C., Ferreira, P.B. 2016. Forage performance of *Paspalum* hybrids from an interspecific cross. *Ciência Rural*. 46, 6, 1025-1031. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150232> (Acessado 18 janeiro 2019).
- Oliveira, R.C., Valls, J.F.M. *Paspalum* em Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB127893> (Acessado 23 novembro 2016).
- Oliveira, R.C., Valls, J.F.M. 2002. Taxonomia de *Paspalum* L., grupo Linearia (Gramineae – Paniceae) do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 25, 4, 371-389. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042002012000001> (Acessado 18 dezembro 2018).
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-na update. *Bioinformatics*. 28, 2537-2539.
- Pereira, E.A. Melhoria genética por meio de hibridizações interespecíficas no grupo Plicatula - gênero *Paspalum*. 2013. 167f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

- Pereira, E.A., Barros, T., Volkmann, G.K., Battisti, G.K., Silva, J.A.G., Simioni, C., Dall’Agnol, M. 2012. Variabilidade genética de caracteres forrageiros em *Paspalum*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 47, 10, 1533-1540. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012001000017> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Pinheiro L.R., Rabbani, A.R.C., Silva, A.V.C, Lédo, A.S., Pereira, K.L.G., Diniz, L.E.C. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. Plant Systematics and Evolution. 298, 10, 1815-1825. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0682-9> (Acessado 18 janeiro 2019).
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155, 945–959. <http://www.genetics.org/content/155/2/945> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Reisch, C., Poschlod, P., Wingender, R. 2003. Genetic differentiation among populations of *Sesleria albicans* Kit. ex Schultes (Poaceae) from ecologically different habitats in central Europe. Heredity. 91, 519-527. <https://www.nature.com/articles/6800350> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Reyno, R., Narancio, R., Speranza, P., Canto, J., López-Carro, B., Hernández, P., Burgueño, J., Real, D., Rizza, M.D. 2012. Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) native to Uruguay. Genetic Resources and Crop Evolution. 59, 8, 1823-1832. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9806-x> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Ribeiro, B.R., Martins, E., Martinelli, G., Loyola, R. 2018. The effectiveness of protected areas and indigenous lands in representing threatened plant species in Brazil. Rodriguésia. 69, 4, 1539-1546. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201869404> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Ribeiro, P.C.C., Pinheiro, L.C., Domingues, R., Forzza, R.C., Machado, M.A., Viccini, L.F. 2013. Genetic diversity of *Vriesea cacuminis* (Bromeliaceae): and endangered and endemic Brazilian species. Genetics and Molecular Research. 12, 2, 1934-1943. <http://dx.doi.org/10.4238/2013> (Acessado 18 janeiro 2019).
- Rio Grande do Sul, 2014. Táxons da flora nativa do Estado Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção. Diário Oficial, Decreto 52.109. <http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/DEC%2052.109.pdf> (Acessado 12 janeiro 2019).
- Rodrigues, J. F. 2010. 81p. Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.
- Rodrigues, L., Berg, C. vd, Póvoa, O., Monteiro, A. 2013. Low genetic diversity and significant structuring in the endangered *Mentha cervina* populations and its implications of conservation. Biochemical Systematics and Ecology. 50, 51-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.007> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Rua, G.H., Speranza, P.R., Vaio, M., Arakaki, M. 2010. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. Plant Systematics and Evolution. 288, 227-243. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0327-9> (Acessado 17 dezembro 2018).

- Rua G.H., Valls J.F.M. 2012. On the taxonomic status of the genus *Thrasypsis* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae): new combinations in *Paspalum*. *Phytotaxa*. 73, 60-66. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.73.1.7> (Acessado 17 dezembro 2018);
- Sawasato, J.T., Dall'Agnol, M., Conceição, D.P., Tafernaberi Júnior, V., Klafke, G.B. 2008. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 37, 8, 1366-1374. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008000800005> (Acessado 27 dezembro 2018).
- Singh, N. Studies on genetic diversity of kodo millets (*Paspalum scrobiculatum* L.) using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter Simple Sequence Repeat Markers (ISSR). 2016. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências)- Biotechnology Centre, Jawaharlal Nehru KrishiVishwaVidyalaya, Jabalpur, 2016.
- Souza-Chies, T.T., Essi, L., Rua, G.H., Valls, J.F.M., Miz, R.B. 2006. A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae). *Genetica*. 126, 15-32. <https://doi.org/10.1007/s10709-005-1428-1> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Valle, J.S., Fonseca, B.K.D., Nakamura, S.S., Linde, G.A., Mattana, R.S., Ming, L.C., Colauto, N.B. 2013. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 15, 1, 47-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722013000100006> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Wu, C., Cheng, Z., Huang, X., Yin, S., Cao, K., Sun, C. 2004. Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species. *Plant Science*. 167, 35-42. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.02.022> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Yadav, Y., Lavanya, G.R., Pandey, S., Verma, M., Ram, C., Arya, L. 2016. Neutral and functional marker based genetic diversity in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum* L.) *Acta Physiol Plant*. 38, 75, 1-12. <http://doi.org/10.1007/s11738-016-2090-1> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Zhang, Z., Chen, Y., Li, D. 2005. Detection of low genetic variation in a critically endangered chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers. *Biochemical Genetics*. 23, 5-6, 239-249. <https://doi.org/10.1007/s10528-005-5215-6> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) – Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*. 20, 176-183. <http://doi.org/10.1006/geno.1994.1151> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Zilli, A.L., Hojsgaard, D.H., Brugnoli, E.A., Acuña, C.A., Honfi, A.I, Urbani, M.H., Quarín, C.L., Martínez, E.J. 2014. Genetic relationship among *Paspalum* species of the subgenus *Anachyris*: Taxonomic and evolutionary implications. *Flora*. 209, 604-612. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2014.08.005> (Acessado 17 dezembro 2018).
- Zuloaga, F.O., Morrone, O. 2005. Revisión de las especies de *Paspalum* para America del Sur Austral (Argentina, Bolívia, Sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Systematic from Missouri Botanical Garden*. 102, 1-297.

1 **4 ARTIGO 2**²

2

3 **Número cromossômico de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls**

4 **(Poaceae), em uma população localizada no município de Santa Maria, RS**

5 **Chromosome number of *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls**

6 **(Poaceae) in the population located in the county of Santa Maria, RS**

7 **Jéssica Mena Barreto de Freitas^{I*} Andrielle Wourtes Kuhn^{II} Liliana Essi^{III} Solange**

8 **Bosio Tedesco^{III}**

9 **- NOTA -**

10

11 **RESUMO**

12 O gênero *Paspalum* apresenta-se como um grupo importante economicamente, por ser
13 muito utilizado como pastagem em campos da região Sul do Brasil e possui nível de ploidia
14 variável entre as suas espécies. *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls é
15 uma gramínea campestre que se encontra ameaçada de extinção. Há poucos estudos para a
16 biologia da espécie, dificultando a realização de planos para sua conservação. A contagem
17 cromossômica apresenta-se como um bom método para a análise da ploidia, apresentando
18 também as associações cromossômicas nas células. O objetivo deste trabalho foi o de realizar
19 a contagem cromossômica de *Paspalum rawitscheri* em uma população localizada no
20 município de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Para a análise, foram coletadas inflorescências
21 a campo, as quais foram fixadas em Carnoy (3:1) por 24h e após, armazenadas em álcool 70%
22 sob refrigeração. Para a confecção das lâminas foi realizada a técnica de esmagamento

² Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista Ciência Rural.

^{I*}Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. E-mail: jessicamenabarretofreitas@gmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS.

^{III}Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS

23 utilizando o corante orceína acética 2%. A população de *P. rawitscheri* do município de Santa
24 Maria apresenta-se como diploide, com número cromossômico $2n = 20$ e os cromossomos
25 possuem um tamanho de $0,25 \mu\text{m}$. Como não foram encontrados registros na literatura sobre o
26 número cromossômico de *P. rawitscheri*, tem-se que $2n = 20$ é o primeiro número
27 cromossômico listado para a espécie. Conclui-se que são necessários mais estudos para a
28 caracterização dessa planta. Como o gênero *Paspalum* apresenta-se predominantemente
29 poliploide, provavelmente devem ocorrer outros níveis de ploidia para *P. rawistcheri*, não
30 apenas indivíduos diploides, como os encontrados nesse trabalho.

31

32 **Palavras-chave:** gramínea campestre, nível de ploidia, cromossomos.

33

34 **ABSTRACT:** Genus *Paspalum* presents itself as an economically important group, due to be
35 widely used as pasture in areas of southern Brazil and has the characteristic of polyploidy varied
36 between their species. *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rueda & Valls is a grass
37 country that is currently threatened of extinction. There are few studies for the biology of the
38 species, what makes it difficult to carry out plans for its conservation. Chromosome counting
39 is as a good method for the analysis of ploidy, also presenting the chromosomal associations in
40 cells. The objective of this work was to perform chromosome counting of *Paspalum rawitscheri*
41 in a population located in the municipality of Santa Maria, Rio Grande do Sul. For the analysis,
42 field inflorescences were collected, which were fixed in Carnoy (3:1) for 24 hours and further
43 stored in 70% alcohol under refrigeration. For the preparation of slides a crushing technique
44 was performed using 2% acetic orcein dye. The population of *Paspalum rawitscheri* in the
45 municipality of Santa Maria presents as diploid with chromosome number $2n = 20$ and
46 chromosomes size of $0.25 \mu\text{m}$. Since no records were found in the literature on the chromosome
47 number of *Paspalum rawitscheri*, it has to be $2n = 20$ chromosome number is the first one listed

48 for the species. We conclude that further studies are needed to characterize this plant. As the
49 *Paspalum* is predominantly polyploid, other levels of ploidy may probably occur for *Paspalum*
50 *rawitscheri*, not just diploid individuals, such as those found in this work.

51

52 **Key-words:** grassy country, ploidy level, chromosomes.

53

54 O gênero *Paspalum*, pertencente à família Poaceae, apresenta $n = 10$ como número
55 básico de cromossomos (BURTON, 1940), com níveis de ploidia variando entre as espécies,
56 de diploides a hexaploides (BURTON, 1940, PAGLIARINI et al., 2001, ADAMOWSKI et al.,
57 2005, POZZOBON et al., 2008). A análise do nível de ploidia e caracterização citogenética das
58 espécies desse gênero desperta interesse de pesquisadores, trazendo informações que poderão
59 ser utilizadas em programas de hibridações e melhoramento genético.

60 *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex. G.H. Rua & Valls é uma gramínea
61 campestre, encontrada naturalmente na região Sul do Brasil. Encontra-se em processo de
62 extinção e está na lista das espécies ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE
63 DO SUL, 2014) como em perigo (EN) e na lista nacional de espécies ameaçadas (BRASIL,
64 2014). Pouco se sabe sobre ela, não sendo encontrados registros sobre o seu número
65 cromossômico.

66 A caracterização de germoplasma busca trazer informações para auxiliar na
67 conservação da espécie (SOSTER, 2009) e também em estudos sobre manejo e utilização da
68 planta (SCHIFINO-WITTMANN, 2009). Nesse aspecto, análises citogenéticas, tais como o
69 número cromossômico, são indispensáveis para realização dessa caracterização.

70 Diversas espécies pertencentes ao gênero *Paspalum* já tiveram seu número
71 cromossômico determinado. Segundo POZZOBON et al. (2008), os resultados apresentaram

72 uma alta variação no número cromossômico de 50 espécies avaliadas, sendo encontrados
73 indivíduos $2n = 12, 20, 24, 30, 40, 50, 60$ e 80 cromossomos.

74 Por apresentarem alta poliploidia, espécies desse gênero são utilizadas em programas
75 de melhoramento genético e estudos filogenéticos (FELICIANO, 2016; PEREIRA et al., 2012;
76 QUESENBERRY et al., 2010; WEILER et al., 2015).

77 Tendo em vista essas considerações, esse trabalho teve como objetivo realizar a
78 contagem cromossômica de *P. rawitscheri* de uma população localizada no município de Santa
79 Maria, Rio Grande do Sul.

80 Para o estudo citogenético foram coletadas inflorescências a campo de *P. rawitscheri*
81 da população de Santa Maria (S29°37'37,5" W53°52'27,1", altitude de 222m), Rio Grande do
82 Sul. O material-testemunho da população foi coletado e depositado no Herbário do
83 Departamento de Biologia (SMDB) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o
84 número de registro 16.908. O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal
85 e Genotoxicidade (LABCITOGEN), UFSM.

86 As inflorescências jovens foram coletadas e colocadas em fixador etanol:ácido acético
87 (3:1) por 24h em temperatura ambiente e, após, armazenadas em álcool 70% sob refrigeração.
88 Para a confecção das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento descrita por GUERRA &
89 SOUZA (2002), utilizando-se as anteras, as quais foram esmagadas e coradas comorceína
90 acética 2%. Foram analisadas 10 células em diacinese, apenas as que apresentaram boa
91 qualidade, com cromossomos espalhados e corados. As células foram fotografadas em
92 microscópio óptico com objetiva de 40x e medidas através de uma ocular micrométrica.

93 O número cromossômico obtido a partir das inflorescências de *P. rawitscheri* da
94 população de Santa Maria foi de $n = 10$ cromossomos, estando os mesmos associados em
95 bivalentes (Figura 1) e os cromossomos apresentaram um tamanho de $0,25 \mu\text{m}$. Em trabalho de
96 ADAMOWISKI et al. (2005), os autores encontraram um acesso, dentre 36 acessos de

97 *Paspalum notatum* Flüggé analisados, com o mesmo nível de ploidia ($2n = 20$). Em trabalho
98 realizado por SARTOR et al. (2011) também foram encontrados indivíduos diploides nas
99 espécies *Paspalum denticulatum* Trin. e *Paspalum rufum* Nees, demonstrando que esse número
100 cromossômico, $2n=20$, pode ser comum em espécies do gênero.

101 HOJSGAARD et al. (2009) analisaram o número cromossômico de 131 acessos de 55
102 espécies do gênero *Paspalum* pertencentes à região subtropical da América do Sul. Os
103 resultados demonstraram seis níveis de ploidia entre os acessos avaliados: diploides,
104 tetraploides, hexaploides, octoploides, triploides e pentaploides. Desses níveis, o tetraploide foi
105 o mais frequente. Além disso, foram relatadas novas contagens: *Paspalum lilloi* Hack. e
106 *Paspalum glabrinode* (Hack.) Morrone & Zuloaga, que apresentaram $2n = 2x = 20$
107 cromossomos; e *Paspalum remotum* J. Rémy, *Paspalum ovale* Nees ex Steud. e *Paspalum*
108 *erianthoides* Lindm., ambos com $2n = 8x = 80$ cromossomos.

109 Em estudo conduzido por BALBINOT (2007), determinou-se o número
110 cromossômico de 93 acessos de *Paspalum notatum*, sendo que 84 acessos avaliados eram de *P.*
111 *notatum* típico, um acesso de *P. notatum* André da Rocha, um acesso de *P. notatum* ecótipo
112 Bagual e sete acessos de *P. notatum* var. *saurae* (Pensacola). O número cromossômico variou
113 para os diferentes acessos, apresentando $2n = 20$, $2n = 40$ e $2n = 60$ cromossomos. Todos os
114 acessos Pensacola apresentaram $2n = 20$ cromossomos com meiose regular e pareamento
115 cromossômico formado por 10 bivalentes. Demonstrando que os diploides normalmente
116 apresentam essa conformação.

117 Em conclusão, a população de Santa Maria, RS, da espécie *P. rawitscheri* apresenta-se
118 como diploide ($n = 10$). Em virtude da alta variação de ploidia de espécies do gênero *Paspalum*,
119 sugere-se que sejam realizados mais estudos citogenéticos da espécie *P. rawitscheri*.

120

121 **AGRADECIMENTOS**

122

123 Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
124 Nível Superior) pelo apoio financeiro.

125

126 **DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE**

127 Não há conflitos de interesse para declarar.

128

129 **REFERÊNCIAS**

130

131 ADAMOWSKI, E.V. et al. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum*
132 accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.773-780. 2005. Disponível em:
133 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572005000500020>> Acesso em: 06 dez. 2018. doi:
134 10.1590/S1415-47572005000500020.

135 BALBINOT, N.D. **Variabilidade citogenética em uma coleção de acessos de *Paspalum***
136 **notatum Flügge**. 2007. 76f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação
137 em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

138 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora**
139 **Ameaçadas de Extinção**. Brasília, 2014. Disponível em:
140 http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf Acesso em: 05 dez.
141 2018.

142 BURTON, G.W. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. **Journal of**
143 **Agricultural Research**, v.60, n.3, p.193–197, 1940. Disponível em:
144 <<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1942.tb14228.x>> Acesso em: 06 dez. 2018. doi:
145 10.1002/j.1537-2197.1942.tb14228.x.

146 FELICIANO, C.D. **Contribuição à sistemática de Paspaleae (Poaceae, Panicoideae):**
147 **Filogenia de *Axonopus* P. Beauv. e estudo taxonômico das espécies ocorrentes no Brasil;**
148 **Revisão das espécies de *Paspalum* L. do clado *Pectinata***. 2016. 427f. Tese (Doutorado em

- 149 Biologia Vegetal) – Curso de Pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de
150 Campinas.
- 151 GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em**
152 **citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131p.
- 153 HOJSGAARD, D. et al. Chromosome numbers and ploidy levels of *Paspalum* species from
154 subtropical South America (Poaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.56, n.4,
155 p.533-545, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9384-0>> Acesso em:
156 06 dez. 2018. doi: 10.1007/s10722-008-9384-0.
- 157 PAGLIARINI, M.S. et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions.
158 **Hereditas**, v.135, p.27-34, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1111/j.1601-](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00027.x)
159 [5223.2001.00027.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.00027.x) Acesso em: 06 dez. 2018. doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00027.x.
- 160 PEREIRA, R.C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para
161 programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1278-1285, 2012.
162 Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000700023>> Acesso em: 06 dez.
163 2018. doi: 10.1590/S0103-84782012000700023.
- 164 POZZOBON, M.T. et al. Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and
165 accessions. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1292-1299, 2008. Disponível em:
166 <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000500014> Acesso em: 06 dez. 2018. doi:
167 10.1590/S0103-84782008000500014.
- 168 QUESENBERRY, K.H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue
169 culture. **Euphytica**, v.175, n.1, p.43-50, 2010. Disponível em: <
170 [https://doi.org/10.1007/s10681-](https://doi.org/10.1007/s10681-010-0165-4)
171 [010-0165-4](https://doi.org/10.1007/s10681-010-0165-4)> Acesso em: 06 dez. 2018. doi: 10.1007/s10681-
- 172 RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual do Meio Ambiente (Sema). **Táxons da flora**
173 **nativa do Estado Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção**. Porto Alegre, 2014. Disponível

174 em: <<http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/DEC%2052.109.pdf>>. Acesso
175 em: 12 jan. 2019.

176 SARTOR, M.E. et al. Ploidy levels and reproductive behaviour in natural populations of five
177 *Paspalum* species. **Plant System Evolution**, v.293, p.31-41, 2011. Disponível em: <
178 <https://www.researchgate.net/publication/251394960>> Acesso em: 06 dez. 2018. doi:
179 10.1007/s00606-011-0416-4.

180 SCHIFINO-WITTMANN, M.T. Estudos citogenéticos em espécies forrageiras nativas. In:
181 PILLAR, V.P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M.S.; JACQUES, A.V.A. **Campos Sulinos,**
182 **conservação e o uso sustentável da biodiversidade.** Brasília/DF: Ministério do Meio
183 Ambiente, 2009. p.139-154.

184 SOSTER, M.T.B. **Caracterização morfológica e citogenética de acessos de *Paspalum***
185 **coletados no Sul do Brasil.** 2009. 95f. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-
186 graduação em Ciências, Universidade Federal de Santa Catarina.

187 WEILER, R.L. et al. Chromosome doubling in *Paspalum notatum* var. sauræ (cultivar
188 Pensacola). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, p.106-111, 2015. Disponível
189 em: <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332015v15n2n19> Acesso em: 06 dez. 2018. doi:
190 10.1590/1984-70332015v15n2n19.

191

192

193

194

195

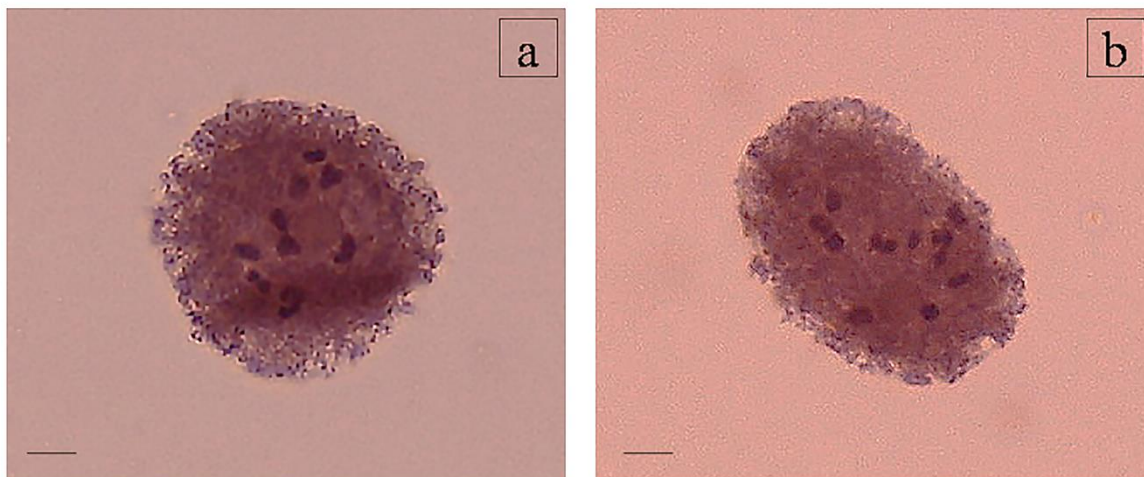
196

197

198

199

200



201

202 Figura 1 - *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls: a) célula em metáfase I203 apresentando $n = x = 10$; b) célula em metáfase I apresentando $n = x = 10$. Escala: 10 μm .

204

205 **5 ARTIGO 3**³

206

207 **Medidas de estômatos, medidas de grãos de pólen e viabilidade polínica de *Paspalum***

208 ***rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls**

209 **Measures of stomata, measures of pollens grains and pollen viability of *Paspalum***

210 ***rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls**

211 **Jéssica Mena Barreto de Freitas^{I*} Andrielle Wourtes Kuhn^{II} Viviane Dal-Souto**

212 **Frescura^{III} Liliana Essi^{II} Solange Bosio Tedesco^{II}**

213

214 **RESUMO**

215 Este trabalho teve como objetivos avaliar o tamanho dos estômatos e dos grãos de
216 pólen, bem como realizar a estimativa da viabilidade polínica de indivíduos de diferentes
217 populações, do Rio Grande do Sul, de *P. rawitscheri*. Para análise do tamanho dos estômatos
218 foram utilizadas folhas frescas de plantas coletadas em Santa Maria, Campestre da Serra e São
219 Martinho da Serra. Para o preparo das lâminas foi utilizado o método de impressão epidérmica
220 da folha adaxial, com adesivo instantâneo universal (Super Bonder®). Foram analisados 50
221 estômatos por lâmina, totalizando 100 estômatos por população, e as medidas avaliadas foram
222 altura e largura. Para a avaliação do tamanho dos grãos de pólen e para a viabilidade polínica,
223 foram utilizadas inflorescências coletadas de plantas, apenas das populações de Santa Maria e

³ Este artigo foi elaborado conforme as normas da revista Ciência Rural.

^{I*}Programa de Pós-graduação em Agrobiologia, Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: jessicamenabarretofreitas@gmail.com. Autor para correspondência.

^{II}Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

^{III}Coordenadoria Acadêmica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Cachoeira do Sul, RS, Brasil.

^{IV}Departamento de Biologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

224 Campestre da Serra, pois as mudas da população de São Martinho da Serra não floresceram no
225 período de estudo. As inflorescências foram fixadas em Carnoy (3:1) por 24h e, após,
226 armazenadas em álcool 70% sob refrigeração. Foram utilizados três corantes para análise da
227 viabilidade, orceína acética 2%, carmim acético 2% e reativo de Alexander. Para a avaliação
228 do tamanho dos grãos de pólen foram utilizadas apenas as lâminas coradas com orceína acética
229 2%. Foram observados 1600 grãos de pólen por população para a viabilidade e foram medidos
230 50 grãos de pólen. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey com 5% de
231 probabilidade de erro pelo programa Sisvar 5.6. Houve diferença significativa entre todas as
232 populações quando analisadas a altura dos estômatos, e altura e largura dos grãos de pólen. A
233 população de Campestre da Serra destacou-se com as maiores médias. Quanto à análise de
234 viabilidade polínica, o reativo de Alexander foi o corante mais eficiente para a espécie, e a
235 população de Santa Maria foi a que apresentou a menor porcentagem de polens viáveis.
236 Conclui-se que as populações avaliadas podem apresentar variabilidade genética, pois houve
237 diferenciação entre os tamanhos dos estômatos e dos grãos de pólen. A viabilidade polínica
238 apresentou-se baixa para a população de Santa Maria diferindo da população de Campestre da
239 Serra.

240 **Palavras-chave:** gramínea, caracteres morfológicos, ploidia, fertilidade.

241

242 **ABSTRACT**

243

244 The objective of this work was to evaluate the size of stomata and pollen grains, as
245 well as to estimate the pollen viability of individuals from different populations of *P.*
246 *rawitscheri* from Rio Grande do Sul, Brasil. To analyze the size of the stomata, fresh leaves of
247 plants collected in Santa Maria, Campestre da Serra and São Martinho da Serra were used. For
248 the preparation of the slides the epidermal impression method of the adaxial sheet was used,
249 with instant universal glue (Super Bonder®). Fifty stomata per leaf were analyzed, from a total

250 of 100 stomata per population, and the measures evaluated were height and width. To evaluate
251 the size of the pollen grains and for the pollen viability, inflorescences were collected from
252 plants of Santa Maria and Campestre da Serra populations. The inflorescences were fixed in
253 Carnoy (3: 1) for 24h and, then, stored in 70% alcohol under refrigeration. Three dyes were
254 used for viability analysis, acetic orcein 2%, acetic carmine 2% and Alexander reactive. To
255 evaluate the size of the pollen grains were only used the blades stained with acetic orcein 2%.
256 A total of 1600 grains of pollen were observed per population for viability and 50 grains of
257 pollen were measured. The statistical analysis was performed by the Tukey test with 5%
258 probability of error by the software Sisvar 5.6. There was a significant difference between all
259 the populations when analyzed the height of the stomata, and height and width of the pollen
260 grains. The population of Campestre da Serra stood out with the highest averages. As for the
261 pollen viability analysis, the Alexander reactive was the most efficient dye for the species, and
262 the population of Santa Maria was the one that presented the lowest percentage of viable
263 pollens. It is concluded that the evaluated populations can present genetic variability, since there
264 was differentiation between the sizes of the stomata and the pollen grains. The pollen viability
265 was low for the population of Santa Maria differing from the population of Campestre da Serra.
266 **Key-words:** grass, morphological characters, ploidy, fertility.

267

268 **INTRODUÇÃO**

269

270 *Paspalum* (Poaceae, Paniceae) é um gênero muito importante por apresentar
271 gramíneas de grande valor forrageiro. Esse grupo apresenta entre 350 e 400 espécies,
272 distribuídas em diferentes regiões da América (ZULOAGA & MORRONE et al., 2005; RUA
273 et al., 2010). As espécies desse gênero são muito estudadas em programas de melhoramento de
274 plantas quanto a hibridizações e técnicas de poliploidização de plantas (MOTTA et al., 2016;

275 WEILER et al., 2015). Apresentam alta poliploidia entre as espécies, variando de diploides a
276 hexaploides (FACHINETTO, 2010; SOSTER, 2009), sendo essa alta variação no nível de
277 ploidia uma das características principais do gênero.

278 Análises citogenéticas são utilizadas para caracterização de um germoplasma, por
279 meio da avaliação do nível de ploidia, comportamento meiótico e mitótico e fertilidade do grão
280 de pólen (BRUNO, 2015; NOLASCO, 2011; POZZOBON et al., 2011). Para análise da
281 poliploidia pode ser utilizado o método de contagem cromossômica e a avaliação de caracteres
282 morfológicos, como medidas estomáticas e análise dos diâmetros do grão de pólen
283 (MARINHO, 2013; TEDESCO et al., 1999). Alguns trabalhos confirmaram que plantas
284 poliploidizadas tendem a ter maiores estômatos e podem também apresentar alteração na
285 densidade estomática (HODGSON et al., 2010; RAIZER, 2017).

286 Além disso, a avaliação da viabilidade do grão de pólen traz informações importantes
287 que podem ser utilizadas em diferentes estudos, como genéticos, palinológicos e taxonômicos
288 (FRESCURA et al., 2012). O estudo da viabilidade polínica traz dados que podem ser utilizados
289 em programas de melhoramento de plantas, demonstrando o sucesso na fertilização de plantas
290 através de grãos de pólen viáveis (CABRAL et al., 2013). Como o gênero *Paspalum* apresenta
291 alta poliploidia, e é utilizado em programas de melhoramento e hibridizações, é interessante a
292 avaliação da viabilidade polínica de espécies desse grupo.

293 A espécie *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G. H. Rua & Valls é uma gramínea
294 e encontra-se distribuída na região Sul do Brasil. São escassos os estudos sobre essa espécie,
295 com pouca ou nenhuma informação sobre seu modo de reprodução, fenologia e níveis de
296 ploidia. Além disso, a espécie está incluída na lista estadual de espécies ameaçadas (RIO
297 GRANDE DO SUL, 2014) e na lista vermelha da Flora do Brasil como em perigo (EN)
298 (BRASIL, 2014), tornando-se de suma importância o estudo de sua biologia. Assim, o objetivo
299 deste trabalho foi avaliar as medidas dos estômatos e dos grãos de pólen, além de estimar a

300 viabilidade polínica de indivíduos de diferentes populações, do Rio Grande do Sul, de *P.*
301 *rawitscheri*.

302

303 MATERIAL E MÉTODOS

304

305 *Coleta do material botânico*

306 O material botânico utilizado para as análises foi coletado em três populações de *P.*
307 *rawitscheri* diferentes, cada uma pertencente a um dos seguintes municípios: Santa Maria
308 (29°37'37.5S 53°52'27.1"W e elevação de 222m), Campestre da Serra (28°40'42.7"S
309 51°03'50.3"W e elevação de 770m) e São Martinho da Serra (29°24'54.8"S 54°61'09.6"W e
310 elevação de 305m). A coleta de seis indivíduos pertencentes a essas populações (Tabela 1) foi
311 realizada no período de novembro de 2016 a fevereiro de 2017, tendo-se incorporado material-
312 testemunho no herbário SMDB do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa
313 Maria (UFSM). Para as análises foram coletadas plantas a campo, as quais foram replantadas e
314 cultivadas em estufa plástica do Departamento de Biologia na UFSM. O desenvolvimento dos
315 experimentos foi realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade
316 (LABCITOGEN).

317

318 *Medidas estomáticas*

319 Para a avaliação das medidas estomáticas utilizou-se folhas frescas, coletadas das
320 plantas cultivadas em estufa plástica, de seis indivíduos de *P. rawitscheri*. As folhas foram
321 coletadas no mesmo dia da confecção das lâminas, no período vespertino. O preparo das
322 lâminas seguiu a metodologia de impressão epidérmica da folha adaxial, com adesivo
323 instantâneo universal (Super Bonder®) (SEGATTO et al., 2004).

324 Foram analisados dois indivíduos por população (Tabela 1), sendo preparada uma
325 lâmina por indivíduo e, em cada uma delas, analisados 50 estômatos. A análise foi executada
326 em microscópio óptico com objetiva de 40x, através de uma ocular micrométrica, utilizando-se
327 os campos das lâminas com maior número aparente de estômatos por área. Foram realizadas
328 duas medições para cada estômato: largura (diâmetro polar) e altura (diâmetro equatorial).

329

330 *Medidas dos grãos de pólen*

331 Para a avaliação das medidas dos grãos de pólen foram coletadas inflorescências das
332 plantas cultivadas em estufa, pertencentes as populações de Santa Maria e Campestre da Serra
333 (Tabela 1). A população de São Martinho da Serra não floresceu em estufa no período de
334 realização dos experimentos, impossibilitando a análise dos seus grãos de pólen.

335 As inflorescências foram coletadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24h e,
336 após, armazenadas em álcool 70% sob refrigeração. As lâminas foram preparadas utilizando a
337 técnica de esmagamento descrita por GUERRA & SOUZA (2002) e foi utilizada o corante
338 orceína acética 2%.

339 Foram analisadas duas lâminas por população (uma lâmina de cada indivíduo) e 50
340 grãos de pólen por lâmina, totalizando 100 grãos de pólen por população. A avaliação foi feita
341 por microscópio óptico com objetiva de 40x utilizando uma ocular micrométrica para a
342 medição.

343

344 *Viabilidade polínica*

345 Para a avaliação da viabilidade polínica também foram coletadas inflorescências das
346 plantas cultivadas em estufa, pertencentes as populações de Santa Maria e Campestre da Serra
347 (Tabela 1).

348 As inflorescências foram coletadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 24h e,
349 após, armazenadas em álcool 70% sob refrigeração. As lâminas foram preparadas por meio da
350 técnica de esmagamento (GUERRA & SOUZA, 2002) e para a análise da viabilidade polínica
351 foram utilizados três métodos colorimétricos diferentes, a orceína acética 2%, o carmim acético
352 2% e o reativo de Alexander. Essa análise foi utilizada para estimar a viabilidade e também
353 para verificar o corante mais eficiente para a espécie.

354 Os grãos de pólen corados com orceína acética 2% foram considerados viáveis quando
355 apresentaram coloração rosa escuro (ou púrpura) e, considerados inviáveis, quando pouco
356 corados ou não corados. Para o carmim acético 2% foram considerados viáveis os grãos de
357 pólen corados em vermelho e, inviáveis, os pouco corados ou não corados.

358 Em contrapartida, para o corante reativo de Alexander foram considerados grãos de
359 pólen viáveis aqueles que apresentaram coloração púrpura e inviáveis os de coloração azul-
360 esverdeada. Essa cor ocorre devido a dois componentes presentes no corante reativo de
361 Alexander, fucsina ácida e verde de malaquita, que interagem com o protoplasma e a celulose
362 da parede do grão de pólen (MUNHOZ et al., 2008). Foram analisados 1600 grãos de pólen por
363 corante para cada população.

364

365 *Análise estatística*

366 Os dados da análise das medidas dos estômatos, das medidas dos grãos de pólen e da
367 viabilidade polínica foram avaliados, separadamente, por meio do teste de Tukey a 5% de
368 probabilidade de erro, utilizando-se o programa Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2014).

369

370 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

371

372 Após análise das medidas de estômatos (Figura 1) e grãos de pólen de cada uma das
373 populações estudadas, verificou-se que a população de Santa Maria apresenta os menores
374 valores (Tabela 2). Já Campestre da Serra foi a população que apresentou os maiores valores
375 para as medidas de grão de pólen e para a altura dos estômatos, igualando-se a São Martinho
376 da Serra apenas na largura de estômato.

377 Tal diferença indica a possibilidade de haver níveis de ploidia distintos entre os
378 indivíduos de Santa Maria e Campestre da Serra. KHAZAEI et al. (2010) relataram que em
379 espécies de *Triticum* (*Triticum monococcum* L., *Triticum durum* Desf. e *Triticum aestivum* L.)
380 a largura dos estômatos era maior nos poliploides do que nos diploides. Também em estudo
381 realizando indução e identificação de poliploidia de *Hymenaea courbaril* L. var. *stilbocarpa*
382 (Hayne) Lee et Lang, demonstrou-se que os meristemas radiculares que foram expostos ao
383 herbicida trifluralin 3 μ M por 96h, causando duplicação do genoma, apresentaram o maior
384 tamanho médio dos estômatos quando comparados com os demais tratamentos (exposição de
385 24h, 48h e 72h ao herbicida trifluralin 3 μ M) (BONA et al., 2016).

386 Trabalhos como os comentados anteriormente confirmam a ideia de que pode haver
387 uma relação entre o nível de ploidia e caracteres morfológicos e ainda, que quanto maior for o
388 número cromossômico maior será o tamanho dos estômatos. Em contrapartida, em trabalho
389 realizado por VICHATO et al. (2006), notou-se que plantas tetraploides de *Dendrobium nobile*
390 Lindl apresentaram diâmetro polar e equatorial menores do que em plantas diploides da mesma
391 espécie.

392 Analisando-se os indivíduos de cada população de *P. rawitscheri*, observou-se que na
393 população de Santa Maria há variabilidade nas medidas de altura de estômato e altura de grão
394 de pólen (Tabela 3). Já para a população de Campestre da Serra há variabilidade para todas as
395 variáveis apresentadas na Tabela 3.

396 Em estudo realizado por VIEIRA (2014), foram analisados os diâmetros do complexo
397 estomático de acessos de *Paspalum stellatum* Hum. & Bonpl ex Flüggé, com níveis de ploidia
398 variáveis e de dois tipos de ambientes, úmido e seco. Para a medida largura, os citotipos 937
399 (2n = 48) e 973 (2n = 52) apresentaram maior largura estomática dentre os acessos analisados.
400 No entanto, o citotipo 1010 (2n = 60) apresentou menor largura. Enquanto que para a medida
401 altura, os citotipos 255 (2n = 20), 973 (2n = 52) e 1019 (2n = 52) apresentaram maior altura
402 quando comparado aos demais. Já o citotipo 1010 (2n = 60) foi o que apresentou menor altura.
403 Quando comparados os ambientes, houve diferença significativa entre eles apenas na medida
404 largura. E esse estudo demonstrou que pode haver diferença no tamanho dos estômatos e
405 diâmetro dos grãos de pólen entre indivíduos de uma mesma espécie.

406 Além da análise de tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen, a viabilidade polínica
407 também foi verificada a partir do uso de três métodos de coloração diferentes (Figura 2). Ao
408 comparar esses métodos (Tabela 4), observou-se que o corante orceína acética foi o que
409 apresentou resultados de maior viabilidade polínica nas duas populações avaliadas, Santa Maria
410 (99,75%) e Campestre da Serra (99,5%).

411 Ao comparar as médias gerais de porcentagem de viabilidade dos corantes, a orceína
412 acética 2% foi o único corante que diferiu estatisticamente de todos os demais. Em outros
413 trabalhos também foi demonstrado que a orceína normalmente demonstra a maior taxa de
414 viabilidade em grãos de pólen de diferentes espécies.

415 Ao comparar a viabilidade polínica de acessos de *Crotalaria juncea* L. do estado do
416 Rio Grande do Sul por meio dos corantes, orceína acética 2% e reativo de Alexander, COELHO
417 et al. (2012) demonstraram uma alta viabilidade polínica para os grãos de pólen corados com
418 orceína acética 2%, cujo valor da viabilidade foi de 98,96%, diferindo estatisticamente da média
419 do reativo de Alexander (83,37%). Apesar das médias gerais terem sido igualmente altas para
420 os dois corantes, o trabalho também mostrou que em três dos dez acessos analisados de C.

421 *juncea* a porcentagem de pólen viáveis para o coranteorceína foi de 100%. Trabalhos como
422 esse corroboram com o fato de que o coranteorceína acética 2% pode superestimar a
423 porcentagem de viabilidade polínica, dificultando a distinção de grãos de pólen viáveis e
424 inviáveis (FRESCURA et al., 2012; HISTER & TEDESCO 2016).

425 Quando observados os dados do corante carmim acético 2% para *P. rawitscheri*,
426 notou-se que a porcentagem de viabilidade polínica no município de Santa Maria foi baixa
427 (47,31%), quando comparado ao município de Campestre da Serra (76,06%). Mesmo assim,
428 não houve diferença significativa entre as duas populações.

429 O carmim acético foi efetivo para diferenciar os pólen viáveis dos inviáveis. Outros
430 trabalhos também demonstraram que esse é um método colorimétrico bastante eficaz para a
431 diferenciação da viabilidade de grãos de pólen. RIBEIRO (2016) avaliou a viabilidade polínica
432 através do corante carmim acético 2%, de diferentes espécies do gênero *Mesosetum* Steud.:
433 *Mesosetum alatum* Filg., *Mesosetum ansatum* (Trin.) Kuhlm., *Mesosetum bifarium* (Hack.)
434 Chase, *Mesosetum chaseae* Lucas, *Mesosetum compressum* Swallen, *Mesosetum elytrochaetum*
435 (Hack.) Swallen e *Mesosetum rottboellioides* (Kuhnt) Hitchc. Nesse trabalho, houve uma alta
436 taxa de diferenciação entre as porcentagens de viabilidade, destacando-se a espécie *M. ansatum*
437 com a mais alta porcentagem de viabilidade (99,16%) e, *M. chaseae*, com a mais baixa
438 (27,69%). Demonstrando que o carmim acético 2% é um corante confiável para avaliação de
439 viabilidade polínica.

440 Quando os grãos de pólen de *P. rawitscheri* foram corados comorceína acética 2% e
441 carmim acético 2%, as porcentagens de viabilidade não diferiram significativamente entre as
442 duas populações. No entanto, quando corados com reativo de Alexander houve diferença
443 significativa entre as populações (Tabela 4).

444 Em pesquisa realizada por AULER et al. (2006) foi encontrado resultado semelhante
445 quando analisada a viabilidade polínica de oito populações da espécie *Baccharis trimera* (Less)

446 DC. dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A diferença da viabilidade dos grãos
447 de pólen entre cinco das populações avaliadas (Santa Maria, Arroio Grande, Reserva Biológica
448 da Corsan, São Vicente do Sul e EPAGRI Caçador) só foi possível com o reativo de Alexander,
449 mostrando que este foi mais eficiente que a orceína acética e que o carmim propiônico. O
450 mesmo ocorreu no presente trabalho, onde as duas populações de *P. rawitscheri* avaliadas
451 apresentaram viabilidades polínicas distintas estatisticamente através do método de coloração
452 com reativo de Alexander.

453 Entre as duas populações avaliadas, nota-se que Santa Maria apresentou menor média
454 de porcentagem de viabilidade (30,13%) quando comparado com Campestre da Serra (79,31%)
455 (Tabela 4). Sendo que, um valor abaixo de 70% para a viabilidade polínica é considerado baixo,
456 podendo indicar problemas de fertilidade nos indivíduos de uma espécie, a população de Santa
457 Maria pode estar em declínio devido a sua baixa viabilidade de grãos de pólen.

458

459 **CONCLUSÃO**

460

461 Conclui-se que pode haver variabilidade genética entre as populações de *P. rawitscheri*
462 de Santa Maria e de Campestre da Serra, já que essas populações apresentaram diferença
463 significativa entre o tamanho dos estômatos e de grãos de pólen. Outra evidência, que pode
464 corroborar com essa ideia, é que as duas populações apresentam uma maior distância
465 geográfica, podendo haver uma barreira entre elas.

466 O melhor método de coloração para a avaliação da viabilidade polínica de indivíduos
467 de *P. rawitscheri* foi o reativo de Alexander, pois evidenciou uma diferença significativa entre
468 as duas populações analisadas, Santa Maria e Campestre da Serra.

469 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

470 Não temos conflitos de interesse a declarar.

471

472 **REFERÊNCIAS**

473

474 AULER, N.M.F. et al. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em
475 populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

476 **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.55-63, 2006. Disponível em: <
477 http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06/artigo10_v8_n2.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2018.

478 BONA, D.A.O. et al. Indução e identificação de poliploidia em *Hymenaea courbaril* L. var.
479 *stilbocarpa* (Hayne) Lee et Lang. **Ciência Florestal**, v.26, n.4, p.1331-1337, 2016. Disponível
480 em: < <http://dx.doi.org/10.5902/1980509825151>.>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi:
481 10.5902/1980509825151.

482 BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Lista de Espécies da Flora Brasileira**
483 **Ameaçadas de Extinção**. Brasília, 2014. Disponível em:
484 <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/179_05122008033615.pdf>. Acesso em:
485 26 nov. 2018.

486 BRUNO, L.R.G.P. **Caracterização morfoagronômica e citogenética de capim buffel do**
487 **banco ativo de germoplasma de *Cenchrus***. 2015. 56f. Dissertação (Mestrado em Recursos
488 Genéticos Vegetais) – Curso de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade
489 Estadual de Feira de Santana.

490 CABRAL, J.C. et al. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L.
491 baseada em testes colorímetros. **Enciclopédia biosfera**, v.9, n.17, p.2780- 2788, 2013.

492 Disponível em: <
493 [http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20BIOLOGICAS/estimativa%20da](http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20BIOLOGICAS/estimativa%20da%20viabilidade.pdf)
494 [%20viabilidade.pdf](http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20BIOLOGICAS/estimativa%20da%20viabilidade.pdf)>. Acesso em: 26 nov. 2018.

- 495 COELHO, A.P.D. et al. Pollen grain viability in accessions of *Crotalaria juncea* L.
496 (FABACEAE). **Agrociência**, v.46, n.5, p.481-487, 2012. Disponível em: <
497 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30223138005>>. Acesso em: 26 nov. 2018.
- 498 FACHINETTO, J.M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação**
499 **do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2010. 142f.
500 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade
501 Federal do Rio Grande do Sul.
- 502 FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons.
503 **Ciência Agrotécnica**, v.38, n.2, p.109-112, 2014. Disponível em:
504 <<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>. Acesso em: 19 jan. 2019 doi:
505 10.1590/S1413-70542014000200001.
- 506 FRESCURA, V.D. et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using
507 different staining methods. **Biocell**, v.36, n.3, p.143-145, 2012. Disponível em: <
508 http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-95452012000300007>.
509 Acesso em: 26 nov. 2018.
- 510 GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em**
511 **citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131p.
- 512 HISTER, C.A.L.; TEDESCO, S.B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium*
513 *cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas**
514 **Medicinais**, v.18, n.1, p.135-141, 2016. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1590/1983-](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_081)
515 [084X/15_081](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_081)>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi: 10.1590/1983-084X/15_081.
- 516 HODGSON, J.G. et al. Stomatal vs. Genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the
517 genomic dog? **Annals of Botany**, v.105, n.4, p.573-584, 2010. Disponível em:
518 <www.aob.oxfordjournals.org>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi: 10.1093/aob/mcq011.

- 519 KHAZAEI, H.; MONNEVEUX, P.; HONGBO, S. Variation for stomatal characteristics and
520 water use efficiency among diploid, tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces. **Genetic**
521 **Resources Crop Evolution**, v.57, p.307-314, 2010. Disponível em:
522 <<https://doi.org/10.1007/s10722-009-9471-x>>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi:
523 10.1007/s10722-009-9471-x
- 524 MARINHO, R.C. **Variabilidade genética e variação de ploidia em espécies de *Eriotheca***
525 **(Bombacoideae- Malvaceae) com diferentes sistemas reprodutivos**. 2013. 141f. Dissertação
526 (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica,
527 Universidade Federal de Uberlândia.
- 528 MOTTA, E.A.M. et al. Forage performance of *Paspalum* hybrids from an interspecific cross.
529 **Ciência Rural**, v.46, n.6, p.1025-1031, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1590/0103-](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150232)
530 [8478cr20150232](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150232)>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi: 10.1590/0103-8478cr20150232.
- 531 MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica.
532 **Revista Brasileira Botânica**, v.31, n.2, p.209-214, 2008. Disponível em:
533 <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042008000200003>>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi:
534 10.1590/S0100-84042008000200003.
- 535 NOLASCO, C.A. **Caracterização citogenética e morfológica de híbridos de mandioca**
536 **(*Manihot esculenta*)**. 2011. 46f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Curso de Pós-
537 graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- 538 POZZOBON, M.T. et al. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta.
539 **Horticultura Brasileira**, v.29, n.2, p.212-216, 2011. Disponível em: <
540 <http://www.scielo.br/pdf/hb/v29n2/a13v29n2.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2018.
- 541 RAIZER, M.D.M. **Identificação e caracterização de plantas poliploides de *Heliconia***
542 ***chartacea* var. *Sexy Pink***. 2017. 126p. Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) – Curso de
543 Pós-graduação em Agronomia Tropical, Universidade Federal do Amazonas.

- 544 RIBEIRO, A.R.O. **Estudos cromossômicos e reprodutivos em espécies de *Mesosetum* Steud.**
545 **(Poaceae: Paspaleae).** 2016. 116p. Tese (Doutorado em Botânica) – Curso de Pós-graduação
546 em Botânica, Universidade de Brasília.
- 547 RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual do Meio Ambiente (Sema). **Táxons da flora**
548 **nativa do Estado Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção.** Porto Alegre, 2014. Disponível
549 em: <<http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/DEC%2052.109.pdf>>. Acesso
550 em: 12 jan. 2019.
- 551 RUA, G.H. et al. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA
552 and morphology. **Plant Systematic and Evolution**, v.288, p.227-243, 2010. Disponível em:
553 <<https://doi.org/10.1007/s00606-010-0327-9>>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi:
554 10.1007/s00606-010-0327-9.
- 555 SEGATTO, F. B. et al. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata.
556 **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1597-1601, 2004. Disponível em:
557 <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500042>>. Acesso em: 16 mar. 2018. doi:
558 10.1590/S0103-84782004000500042.
- 559 SOSTER, M.T.B. **Caracterização morfológica e citogenética de acessos de *Paspalum***
560 **coletados no Sul do Brasil.** 2009. 95p. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-
561 graduação em Ciências, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 562 TEDESCO, S.B. et al. Diâmetro de grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos
563 diploides e tetraploides de *Hemarthria altissima* (Poiret) Stapf & Hubbard (Gramineae).
564 **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.273-276, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1590/S0103-](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000200014)
565 [84781999000200014](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84781999000200014)>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi: 10.1590/S010384781999000200014.

566 VIEIRA, J.P.S. **Anatomia da lâmina foliar de acessos de *Paspalum stellatum* HUM. &**
567 **BONPL. ex FLÜGGÉ (Poaceae), com diferentes tipos de ploidia.** 2014. 71p. Dissertação
568 (Mestrado em Botânica) – Curso de Pós-graduação em Botânica, Universidade de Brasília.

569 VICHATO, M.R.M. et al. Análises estomática e morfométrica de folhas de plantas diploides
570 e tetraploides de *Dendrobium nobile* Lindl. *Ceres*, v.53, n.310, p.541-548, 2006. Disponível
571 em: <<http://www.redalyc.org/pdf/3052/305226675007.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

572 ZULOAGA, F.O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para America del Sur
573 Austral. (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). **Monographs in**
574 **Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v.102, p.1-297, 2005.

575 WEILER R.L. et al. Chromosome doubling in *Paspalum notatum* var. *saurae* (cultivar
576 Pensacola). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.15, p.106-111, 2015. Disponível
577 em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332015v15n2n19>>. Acesso em: 26 nov. 2018. doi:
578 10.1590/1984-70332015v15n2n19.

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592 Tabela 1 - Indivíduos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls utilizados
 593 para análise das medidas dos estômatos e dos grãos de pólen

ESTÔMATO			GRÃO DE PÓLEN		
População	Indivíduo	Identificação*	População	Indivíduo	Identificação
Santa Maria	1	Essi, L. 749A	Santa Maria	1	Essi, L. 749B
	2	Essi, L. 749B		2	Essi, L. 749D
Campestre da Serra	1	Essi, L. 766D	Campestre da Serra	1	Essi, L. 766C
	2	Essi, L. 766K		2	Essi, L. 766M
São Martinho da Serra	1	Essi, L. 1049A			
	2	Essi, L. 1049N			

594 *Número de identificação iguais seguidos de letras distintas representam indivíduos diferentes
 595 de um mesmo local de coleta.

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610 Tabela 2 - Médias das alturas e larguras dos estômatos e grãos de pólen das populações de
 611 *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.

POPULAÇÃO	Média da altura do estômato (μm)	Média da largura do estômato (μm)	Média da altura do grão de pólen (μm)	Média da largura do grão de pólen (μm)
Santa Maria	1,65 ^c	3,34 ^b	3,15 ^b	3,93 ^b
Campestre da Serra	1,90 ^a	3,57 ^a	3,66 ^a	4,03 ^a
São Martinho da Serra	1,81 ^b	3,65 ^a	-	-

612 *Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo
 613 teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634 Tabela 3 - Médias das alturas e larguras dos estômatos e grãos de pólen dos indivíduos de
 635 *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls.

POPULAÇÃO	INDIVÍDUO	Média da altura do estômato (µm)	Média da largura do estômato (µm)	Média da altura do grão de pólen (µm)	Média da largura do grão de pólen (µm)
Santa Maria	1	1,74 ^a	3,34 ^a	2,94 ^b	4,02 ^a
	2	1,56 ^b	3,34 ^a	3,37 ^a	4,04 ^a
Campestre da Serra	1	1,62 ^b	3,27 ^b	3,52 ^b	4,00 ^a
	2	2,18 ^a	3,86 ^a	3,81 ^a	3,86 ^b
São Martinho da Serra	1	1,74 ^b	3,99 ^a	-	-
	2	1,88 ^a	3,31 ^b	-	-

636 *Médias seguidas pela mesma letra na população não diferem estatisticamente entre si pelo
 637 teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654 Tabela 4 - Viabilidade polínica de populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H.
 655 Rua & Valls.

POPULAÇÃO	MÉTODOS COLORIMÉTRICOS		
	Orceína acética 2%	Carmim acético 2%	Reativo de Alexander
Santa Maria	99,75 ^a	47,31 ^a	30,13 ^b
Campestre da Serra	99,5 ^a	76,06 ^a	79,31 ^a
Média (%)	99,63 ^A	61,69 ^B	54,72 ^B

656 *Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem
 657 estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade de erro.

658

659

660

661

662

663

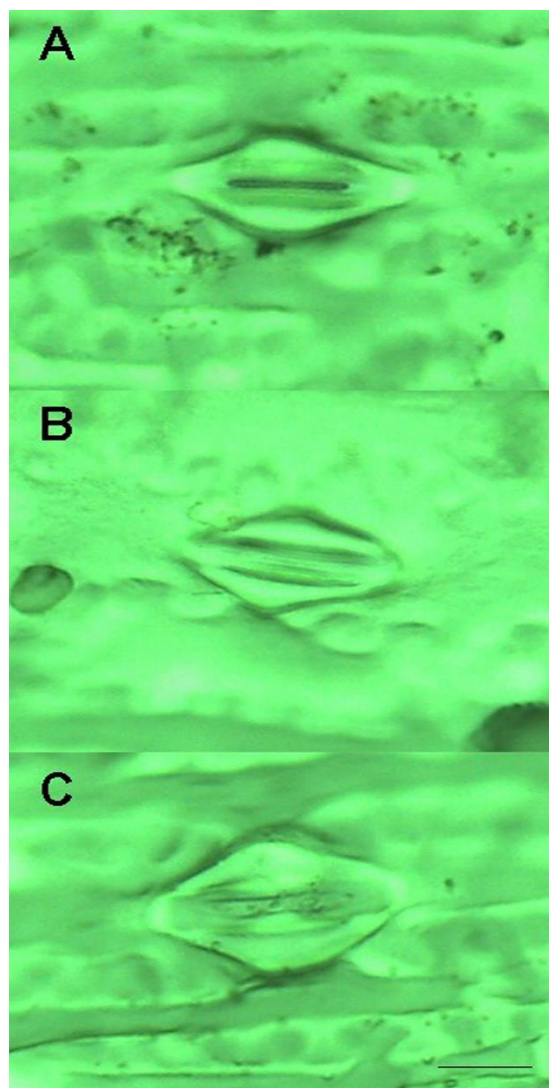
664

665

666

667

668



669

670

671 Figura 1 – Estômatos de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls. A)

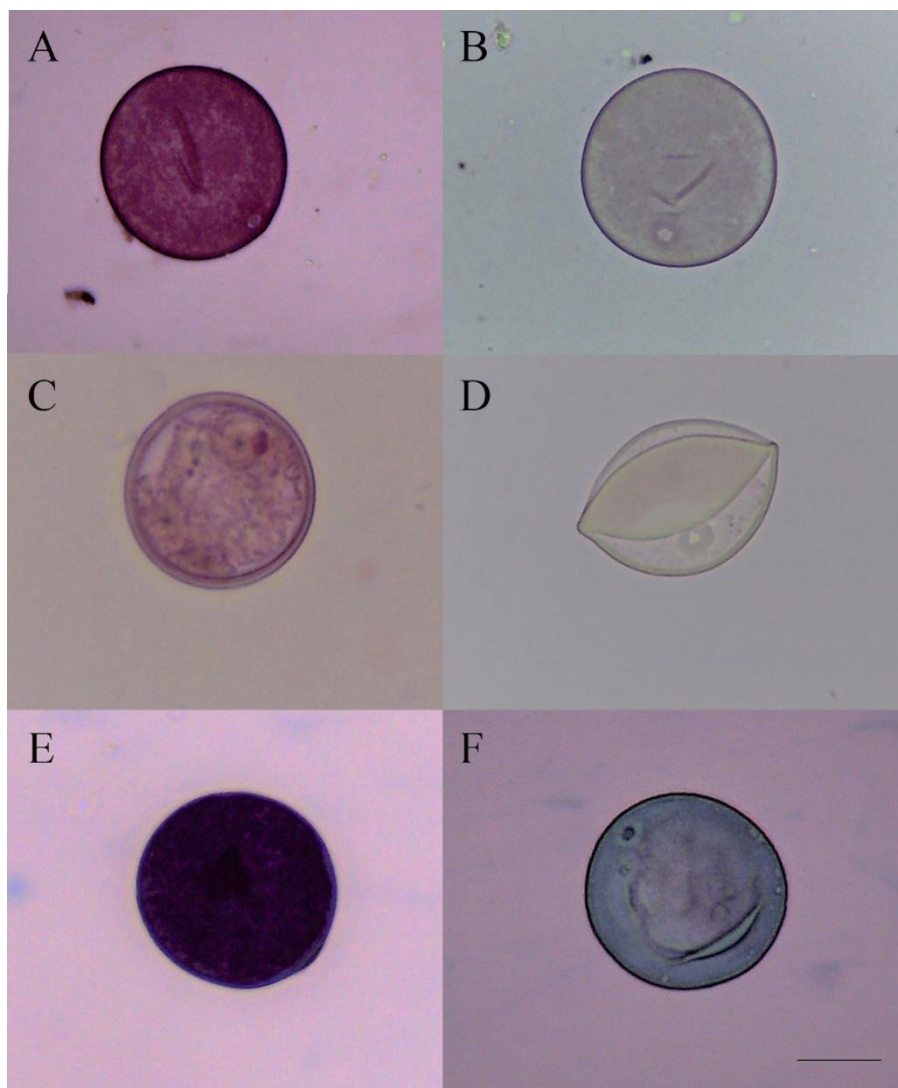
672 Estômato da localidade de Santa Maria, RS; B) Estômato da localidade de São Martinho da

673 Serra, RS; C) Estômato da localidade de Campestre da Serra, RS. Escala representa 2,5 μm .

674

675

676



677

678

679 Figura 2 - Grãos de pólen de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H.Rua & Valls. A)
680 grão de pólen viável corado com orceína acética 2%; B) grão de pólen inviável corado com
681 orceína acética 2%; C) grão de pólen viável corado com carmim acético 2%; D) grão de pólen
682 inviável corado com carmim acético 2%; E) grão de pólen viável corado com reativo de
683 Alexander; F) grão de pólen inviável corado com reativo de Alexander. Escala representa 2,5
684 μm .

6 DISCUSSÃO

A diversidade genética representa a variação genética existente para uma determinada espécie ou grupo de plantas. Quando avaliada a diversidade genética, por meio de marcadores moleculares ISSR, de quatro populações da espécie ameaçada de extinção *Paspalum rawitscheri*, foi detectada uma baixa estrutura populacional dos indivíduos. As taxas de polimorfismos das populações demonstraram-se muito variadas, Campestre da Serra com o maior valor (67,48%) e Vacaria com o menor (29,28%). A diversidade genética foi considerada baixa para todas as populações, sendo a população de Vacaria a que apresentou o menor valor para diversidade ($h=0,130$) e índice de Shannon ($I=0,187$). A população de Vacaria apresentou valores inferiores, provavelmente, pelo fato de ser a população com o menor número de indivíduos, e Campestre da Serra a localidade com o maior número, essa diferença de tamanho populacional influenciou no tamanho amostral.

Ao analisar a diversidade genética, por meio de marcadores ISSR e RAPD, da espécie ameaçada *Dendrobium officinale* Kimura & Migo, Ding et al. (2009), observaram médias variadas de polimorfismo entre as populações analisadas, com valores entre 34,62 e 72,12%. As médias dos índices de diversidade genética de *D. officinale* também foram estimadas, com valores de $h = 0.2207$ e $I = 0.3244$. A variação no tamanho das populações de *D. officinale* pode ter influenciado nos valores de diversidade genética. Ainda, de acordo com os autores, pequenas populações podem sofrer declínios maiores por causa de flutuações ambientais e perder variação genética por meio da deriva genética.

A análise da variância molecular (AMOVA) das populações de *P. rawitscheri* apresentou-se maior dentro das populações do que entre as populações, indicando que há uma maior diferenciação genética entre indivíduos do que entre localidades. Demonstrando novamente uma estrutura populacional baixa, com mistura genética entre indivíduos. Essa mistura foi comprovada por meio da análise Bayesiana, que separou os acessos de *P. rawitscheri* em quatro clusters, sendo que esses agrupamentos apresentaram indivíduos de localidades distintas.

A variância molecular de populações da espécie ameaçada de extinção *Dracocephalum austriacum* L. teve resultados semelhantes obtidos por Dostálek et al. (2010). Os acessos da espécie *D. austriacum* apresentaram maior diferenciação dentro das populações (80,14%) do que entre populações dentro de regiões (9,42%) e entre regiões (10,45%).

Em relação à viabilidade polínica de *P. rawitscheri*, demonstrou-se uma variação das médias, de 30,13 a 99,75% entre as populações analisadas. A população de Campestre da Serra foi a que apresentou maiores médias de viabilidade, para os três corantes utilizados, quando comparada à população de Santa Maria.

O corante orceína acética 2% foi o que apresentou maior viabilidade para Campestre da Serra e Santa Maria, 99,5 e 99,75%, respectivamente. O corante reativo de Alexander foi o que demonstrou menores valores para as populações, apresentando um valor muito baixo para a população de Santa Maria (30,13%). A viabilidade polínica é considerada baixa para valores menores que 70% (HISTER; TEDESCO, 2016).

Outros autores também comprovaram uma maior eficiência do corante reativo de Alexander para a distinção de pólen viáveis e inviáveis (KUHN, 2015; SILVA et al., 2018), já que esse método colorimétrico diferencia nitidamente o protoplasma da parede celular, ajudando na identificação da deficiência de protoplasma na célula inviável (ALEXANDER, 1980).

O corante carmim acético 2% apresentou um valor baixo de viabilidade para a população de Santa Maria, confirmando novamente a baixa fertilidade de indivíduos inseridos nessa localidade. O carmim foi um corante eficiente, juntamente com o reativo de Alexander, para distinguir os grãos de pólen viáveis dos inviáveis.

Os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander já demonstraram-se eficientes para a avaliação da viabilidade polínica em outros trabalhos. Em estudo de Vargas (2015), foi avaliado a viabilidade polínica de acessos da espécie ameaçada *Butia eriospatha* (Mart. ex Drude) Becc com os corantes carmim acético 2%, reativo de Alexander e Cloreto de trifetil tetrazólio (TTC). As médias gerais de viabilidade para os três corantes apresentaram-se altas, com valores de 82,50% (carmim acético 2%), 93,50% (reativo de Alexander) e 71,50% (TTC). Ao contrário do resultado obtido para a espécie *B. eriospatha*, a espécie ameaçada de extinção *P. rawitscheri* utilizada nesse trabalho, apresentou taxas baixas de viabilidade polínica para os corantes carmim acético 2% e reativo de Alexander.

Para a caracterização de um germoplasma a análise do nível de ploidia é crucial, pode ser feita por meio da contagem cromossômica, mas também de forma indireta, por análises morfoanatômicas, havendo relação entre o nível de ploidia e os diâmetros dos estômatos e dos grãos de pólen da planta.

Ao analisar o tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen de três populações de *P. rawitscheri* foi demonstrado que a população de Santa Maria apresentou as menores medidas quando comparada às outras populações analisadas. A diferença nas medidas, tanto de largura

como de altura, foi mais acentuada entre as populações de Santa Maria e Campestre da Serra. Houve diferença significativa entre a população de São Martinho da Serra e as outras duas localidades quando comparadas as medidas dos estômatos, mas a maior diferença foi com a localidade de Campestre da Serra.

Em estudo de Omidbaigi et al. (2010) foi realizada a análise dos diâmetros estomáticos e de grãos de pólen de indivíduos diploides e tetraploides de *Ocimum basilicum* L., cujos resultados demonstraram que as plantas tetraploides apresentaram maior tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen quando comparadas às diploides. Ainda, a média dos diâmetros dos grãos de pólen foi 55% maior nos indivíduos tetraploides quando comparada aos diploides. Confirmando a hipótese de que pode haver relação entre o nível de ploidia e o tamanho dos estômatos e de grãos de pólen.

Além disso, no presente trabalho foi demonstrado uma variabilidade entre os indivíduos analisados das distintas localidades, quando comparados os tamanhos estomáticos e de grãos de pólen. Observou-se que na população de Santa Maria há variabilidade nas medidas de altura de estômato e altura de grão de pólen e, na população de Campestre da Serra, há variabilidade para todas as variáveis analisadas.

Esses resultados confirmam a ideia de que pode haver uma relação entre o nível de ploidia e caracteres morfológicos e ainda, que quanto maior for o número cromossômico maior será o tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen.

O número cromossômico da espécie *P. rawitscheri*, da população de Santa Maria, foi determinado por meio da análise de células meióticas. Essa localidade apresentou-se diploide, com o número cromossômico $2n = 20$. Os resultados citados anteriormente demonstraram que há uma diferença significativamente maior do tamanho estomático e dos grãos de pólen entre as localidades de Santa Maria e Campestre da Serra, apresentando provavelmente níveis de ploidia diferentes. Como a população de Santa Maria apresentou-se como diploide, há a possibilidade de Campestre da Serra ser poliploide, sendo que essa variação na poliploidia é bastante comum para espécies do gênero *Paspalum* (SOSTER, 2009; FACHINETTO, 2010).

Como a espécie ameaçada *P. rawitscheri* apresenta diversidade genética reduzida, baixa estruturação populacional e viabilidade polínica baixa para uma população, a conservação dessa espécie torna-se extremamente necessária.

7 CONCLUSÃO

A diversidade genética para quatro populações naturais de *Paspalum rawitscheri* apresenta-se baixa, além disso a variância molecular para espécie é maior dentro de populações do que entre populações, demonstrando uma diferenciação entre indivíduos. Por meio da análise Bayesiana, constatou-se que os indivíduos dessa espécie estão agrupados em quatro clusters, mas com uma mistura de indivíduos, de distintas localidades, nos agrupamentos. Essa diversidade genética baixa, a diferenciação maior entre indivíduos do que entre populações e essa mistura genética nos clusters demonstra que a espécie ameaçada *P. rawitscheri* apresenta baixa estruturação populacional.

Em relação à viabilidade polínica de *P. rawitscheri*, a população de Santa Maria é a que apresenta menor valor de viabilidade quando comparada à Campestre da Serra. O coranteorceína acética 2% apresenta valores altos de viabilidade para as duas populações, já o carmim acético 2% e o reativo de Alexander apresentam as menores taxas de viabilidade polínica para as populações, principalmente para Santa Maria. Esses resultados indicam que a população de Santa Maria da espécie *P. rawitscheri* possui problemas de fertilidade, sendo, possivelmente, uma das causas de redução da população.

As análises de medidas dos estômatos e dos grãos de pólen de *P. rawitscheri* apresentam valores variados, sendo a população de Santa Maria a que apresenta os menores valores de largura e altura, e Campestre da Serra os maiores. A população de São Martinho da Serra difere das outras duas populações analisadas, mas apenas na altura dos estômatos. Essa variação significativa, dos diâmetros dos estômatos e grãos de pólen, pode indicar uma diferenciação no nível de ploidia entre os indivíduos dessa espécie.

Além disso, a população de Santa Maria apresenta número cromossômico $2n = 20$, sendo diploide. Como comentado anteriormente, essa população apresenta diferença significativa do tamanho dos estômatos e dos grãos de pólen quando comparada a Campestre da Serra, isso indica que a população de Campestre da Serra pode ser poliploide.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie ameaçada de extinção *P. rawitscheri* encontra-se com baixa estrutura populacional, diversidade genética reduzida e viabilidade polínica baixa. Ainda, a espécie *P. rawitscheri* apresenta redução progressiva de suas populações pois, não foram encontrados indivíduos das populações registradas nos estados de Santa Catarina e Paraná. Portanto, planos de conservação e manejo para essa planta são essenciais. A conservação *ex situ* é um método interessante, pois as populações naturais de *P. rawitscheri* encontram-se em locais de degradação de origem antrópica, em beiras de estradas e locais com possível implantação de empreendimentos hidrelétricos. O cultivo dessa espécie em locais de proteção traria diversos benefícios, ajudando em um possível aumento no número de indivíduos. Além disso, estudos sobre tecnologia de sementes e fisiologia da espécie são necessários para melhor auxiliar em sua conservação.

REFERÊNCIAS

- ADAMOWSKI, E. V. et al. Chromosome numbers and meiotic behavior of some *Paspalum* accessions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 773-780, 2005.
- ALEXANDER, M. P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v. 5, n. 1, p. 13-18, 1980.
- ALVIM, P. O. **Viabilidade e conservação de grãos de pólen de milho**. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2008.
- ANIMASAUN, D. A. et al. Assessment of genetic diversity in accessions of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and napier grass (*Pennisetum purpureum*) using microsatellite (ISSR) markers. **Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 4, n. 1, p. 25-35, 2015.
- ARENAS-DE-SOUZA, M. D. et al. Estimativa da viabilidade polínica de indivíduos de *Tabebuia impetiginosa* e *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex. DC.) Standl. (BIGNONIACEAE) através de métodos citoquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 3864-3871, 2014.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994, 655p.
- BALBINOT, N. D. **Variabilidade citogenética em uma coleção de acesso de *Paspalum notatum* Flügge**. 2007. 76 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2018.
- BOLDRINI, I. I.; TREVISAN, R.; SCHNEIDER, A. A. Estudo florístico e fitossociológico de uma área às margens da lagoa do Armazém, Osório, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 4, p. 355-367, 2008.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Use of ISSR fingerprints to detect microsatellites and genetic diversity in several related *Brassica* taxa and *Arabidopsis thaliana*. **Hereditas**, v. 140, p. 245-248, 2004.
- BRUGNOLI, E. A. et al. Diversity in diploid, tetraploid, and mixed diploid-tetraploid populations of *Paspalum simplex*. **Crop Science**, v. 53, n. 4, p. 1509-1516, 2013.
- BURMAN, A. G. The genus *Thrasypsis* PARODI (Gramineae). **Phyton**, n. 1, v. 23, p. 101-116, 1983.
- BURTON, G. W. A cytological study of some species in the genus *Paspalum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 60, n. 3, p. 193–197, 1940.

- CABRAL, J. C. et al. Estimativa da viabilidade polínica em acessos de *Theobroma cacao* L. baseada em testes colorímetros. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 17, p. 2780- 2788, 2013.
- CARDOSO, M. A. et al. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 601-608, 1998.
- CHASE, A. The North American species of *Paspalum*. **Contributions from the United States National Herbarium**, v. 28, p. 1 –310, 1929.
- CIDADE, F. W. et al. Genetic diversity of the complex *Paspalum notatum* Flüggé (Paniceae: Panicoideae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, n. 2, p. 235-246, 2008.
- COLLEVATTI, R. G. et al. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular ecology**, v. 10, p. 349-356, 2001.
- DAVIDE, L. M. C. et al. Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 8, n. 2, p. 199-206, 2009.
- DENHAM, S. S.; ZULOAGA, F. O. Phylogenetic Relationships of the Decumbentes Group of *Paspalum*, *Thrasya*, and *Thrasyopsis* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae). **Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n. 1, p. 545-562, 2007.
- DIEGUES, I. P. et al. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 1, p. 141-150, 2015.
- DING, G. et al. Genetic diversity across natural populations of *Dendrobium officinale*, the endangered medicinal herb endemic to China, revealed by ISSR and RAPD markers. **Russian Journal of Genetics**, v. 45, n. 3, p. 327-334, 2009.
- DOSTÁLEK, T.; MÜNZBERGOVÁ, Z.; PLAČKOVA, I. Genetic diversity and its effect on fitness in an endangered plant species, *Dracocephalum austriacum* L. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 773-783, 2010.
- ELLIS, J. R. et al. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 9, p. 2345-2355, 2006.
- ESSI, L.; SOUZA-CHIES, T. T. Phylogeny of Linearia and Notata groups of *Paspalum* L. (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) and related species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 4, p. 779-791, 2007.
- FACHINETTO, J. M. **Caracterização agronômica, molecular, morfológica e determinação do nível de ploidia em uma coleção de acessos de *Paspalum notatum* Flüggé**. 2010. 142 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FLORA DO BRASIL, em construção. *Paspalum*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>>. Acesso em: 07 dez. 2018.

FOLL, M.; GAGGIOTTI, O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A bayesian perspective. **Genetics**, v. 180, n. 2, p. 977-993, 2008.

FRESCURA, V. D. et al. Pollen viability of *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) using different staining methods. **Biocell**, v. 36, n. 3, p. 143-145, 2012.

HISTER, C. A. L.; TEDESCO, S. B. Estimativa da viabilidade polínica de araçazeiro (*Psidium cattleianum* Sabine) através de distintos métodos de coloração. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 135-141, 2016.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. **Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 35 p.

HUBER, K. G. C. **Desempenho de híbridos do gênero *Paspalum* (*Paspalum plicatulum* x *Paspalum guenoarum* e *Paspalum plicatulum* x *Paspalum leptum*)**. 2015. 54 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

JIAN, L. et al. Reproductive characteristics of *Opisthopappus taihangensis* (Ling) Shih, an endangered Asteraceae species endemic to China. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p. 474-479, 2009.

KIM, C.; NA, H. R.; CHOI, H. K. Conservation genetics of endangered *Brasenia schreberi* based on RAPD and AFLP markers. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 4, p. 260-268, 2008.

KRYCKI, K. C. **Avaliações citoembriológicas, comportamento meiótico e estimativa da fertilidade de plantas poliploidizadas de *Paspalum notatum***. 2015. 51 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

KUHN, A. W. **Viabilidade polínica, genotoxicidade, efeito antiproliferativo e compostos fenólicos de *Peltodon longipes* Kunth ex Benth. (LAMIACEAE)**. 2015. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

LAURENTIN, H. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resource Crop Evolution**, v. 56, n. 2, p. 277-292, 2009.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 2, p. 91-99, 1994.

MARINHO, R. C. **Variabilidade genética e variação de ploidia de espécies de *Eriotheca* (Bombacoideae – Malvaceae) com diferentes sistemas reprodutivos**. 2013. 141 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)–Universidade Federal de Uberlândia, MG, Uberlândia, 2013.

MARTINS, K. C. et al. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746-1751, 2010.

MENDONÇA, P. C. **Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites.** 2011. 87 p. Tese (Doutorado em Agronomia)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2011.

MILLACH S. C. K. 1999. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIRÓZ M. A. et al. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro.** Petrolina: Embrapa Semiárido/Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

MUNHOZ, M. et al. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.

OLIVEIRA, N. P. **Estudos polínicos, citogenética e quantidade de DNA nuclear em espécies de *Oenocarpus* Mart. (Arecaceae).** 2012. 98 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.

OLIVEIRA, R. C.; VALLS, J. F. M. *Paspalum*. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB127893>>. Acesso em: 23 maio 2016.

OMIDBAIGI, R. et al. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. **International Journal of Plant Production**, v. 4, n. 2, p. 87-98, 2010.

PADOAN, D. et al. Ploidy levels in *Citrus clementina* affects leaf morphology, stomatal density and water content. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 4, p. 283-290, 2013.

PAGLIARINI, M. S. et al. Cytogenetic characterization of Brazilian *Paspalum* accessions. **Hereditas**, v. 135, n. 1, p. 27-34, 2001.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: II Curso de citogenética vegetal aplicada a recursos genéticos vegetais, Brasília. **Anais...** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF. Brasília: Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 24-41.

PAULA, J. M. **Caracterização e manejo de *Conyza* spp. resistente ao herbicida glifosato.** 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2009.

PEREIRA, R. C. et al. Duplicação cromossômica de gramíneas forrageiras: uma alternativa para programas de melhoramento genético. **Ciência Rural**, v. 42, n. 7, p. 1278-1285, 2012.

POZZOBON, M. T.; VALLS, J. F. M. Cytogeography and variation of stomatal size of *Paspalum glaucescens* (Gramineae; Paniceae) in Southern Brazil. **Euphytica**, v. 116, n. 3, p. 251-256, 2000.

POZZOBON, M. T. et al. Cytogenetic analyses in *Paspalum* L. reveal new diploid species and accessions. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1292-1299, 2008.

QUARÍN, C. M.; BURSON, B. L. Cytology of Sexual and Apomitic *Paspalum* Species. **Cytologia**, v. 56, n. 2, p. 223-228, 1991.

QUEIROZ, S. A.; ALBUQUERQUE, L. G.; LANZONI, N. A. Efeito da endogamia sobre características de crescimento de bovinos da raça Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1014-1019, 2000.

REIS, C. A. O. **Caracterização citogenética e morfológica em uma coleção de acessos de *Paspalum nicorae* Parodi**. 2008. 143 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

REYNO, R. et al. Molecular and cytogenetic characterization of a collection of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) native to Uruguay. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1823-1832, 2012.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciência Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual do Meio Ambiente (Sema). **Táxons da flora nativa do Estado Rio Grande do Sul ameaçadas de extinção**. Porto Alegre, 2014. Disponível em: <<http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/DEC%2052.109.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Escola Superior da Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

ROOS, A. A. biodiversidade e a extinção das espécies. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 7, n. 7, p. 1494-1499, 2012.

RUA, G. H. et al. A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. **Plant Systematics and Evolution**, v. 288, n. 3-4, p. 227-243, 2010.

RUA, G. H.; VALLS, J. F. M. On the taxonomic status of the genus *Thrasypopsis* (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae): new combinations in *Paspalum*. **Phytotaxa**, v. 73, p. 60-66, 2012.

RUCHEL, Q. et al. Caracterização morfoanatómica, contagem cromossômica e viabilidade polínica de biótipos de azevém suscetível e resistentes ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 33, n. 3, p. 567-578, 2015.

SALATI, E.; SANTOS, A. A.; KLABIN, I. Temas ambientais relevantes. **Estudos avançados**, v. 20, n. 56, p. 107-127, 2006.

SANTOS, A. C. C. **Análise citogenética em acessos de *Paspalum atratum* (Poaceae)**. 2013. 54 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento)—Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2013.

SANTOS, C. A. F. et al. Variabilidade genética, com base em marcadores RAPD, de três espécies arbóreas ameaçadas de extinção no semi-árido brasileiro. **Scientia Forestalis**, n. 74, p. 37-44, 2007.

SANTOS, T. A. et al. Viabilidade polínica em *Bertholletia excels* Bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorímetros. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 3136-3144, 2015.

SARTOR, M. E. et al. Patterns of genetic diversity in natural populations of *Paspalum* agamic complexes. **Plant Systematic and Evolution**, v. 299, n. 7, p. 1295-1306, 2013.

SAWASATO, J. T. et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1366-1374, 2008.

SCATAGLINI, A. et al. Phylogeny of New World *Paspalum* (Poaceae, Panicoideae, Paspalae) based on plastid and nuclear markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 5, p. 1051-1070, 2014.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Estudos citogenéticos em espécies forrageiras nativas. In: PILLAR, V. P. et al. **Campos Sulinos, conservação e o uso sustentável da biodiversidade**. Brasília/DF: Ministério do Meio Ambiente, 2009. cap. 11, p. 155-162.

SILVA, A. S. **Delimitação taxonômica e variabilidade genética de *Paspalum polyphyllum* Nees ex. Trin. e *Paspalum bicilium* Mez (Poaceae, Paspaleae)**. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado em Botânica)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SILVA, D. F. et al. Viabilidade polínica e quantificação dos grãos de pólen em espécies de fisális. **Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 365-373, 2017.

SILVA, J. C. et al. Estudo da viabilidade polínica em acessos de espécies silvestres do gênero *Manihot*. In: Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido. **Anais... Embrapa Semiárido, Documentos 283**. Petrolina: Embrapa Semiárido, v. 13, p. 311-316, 2018.

SILVA, L. N. et al. Assessing the genetic diversity and population structure of the endangered *Chascolytrum bulbosum* (Poaceae, Poaeae) using AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 236-242, 2016.

SILVA, M. R. **Caracterização física e anatômica de folhas de acessos de bananeira com diferentes ploidias**. 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)—Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Recôncavo Bahiano, BA, 2012.

SILVA, P. A. K. X. M. **Indução de poliploidia em mandioca**. 2014. 71 p. Tese (Doutorado em Ciências)—Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SORENG, R. J. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 53, n. 2, p. 117-137, 2015.

SOSTER, M. T. B. **Caracterização morfológica e citogenética de acessos de *Paspalum* coletados no sul do Brasil**. 2009. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

SOUZA-CHIES, T. T. et al. A preliminary approach to the phylogeny of the genus *Paspalum* (Poaceae). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 15-32, 2006.

SOUZA, F. F.; QUEIROZ, M. A. Avaliação de caracteres morfológicos úteis na identificação de plantas poliploides de melancia. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 516-520, 2004.

SOUZA, H. A. V.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 1, p. 49-56, 2010.

TEDESCO, S. B. **Morfologia, microsporogênese e modo de reprodução das espécies brasileiras do gênero *Adesmia* (Leguminosae)**. 2000. 146 p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2000.

TEDESCO, S. B.; BATTISTIN, A.; VALLS, J. F. M. Diâmetro de grãos de pólen e tamanho dos estômatos em acessos diploides e tetraploides de *Hemarthria altissima* (Poiret) Stapf & Hubbard (Gramineae). **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 273-276, 1999.

VALLS, J. F. M. et al. O patrimônio florístico dos Campos: potencialidades de uso e a conservação de seus recursos genéticos. In: Pillar, V.P. et al. (Eds.) **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: MMA, 2009. cap. 10, p. 139-154.

VARGAS, J. R. ***Butia eriospatha* (Arecaceae): comportamento meiótico, palinologia e biometria de frutos**. 2015. 39 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC, 2015.

VICHIATO, M. R. M. et al. Análise estomática e morfométrica de folhas de plantas diploides e tetraploides de *Dendrobium nobile* Lindl. **Revista Ceres**, v. 53, n. 310, p. 541-548, 2006.

VIEIRA, J. P. S. **Anatomia da lâmina foliar de acessos de *Paspalum stellatum* HUM. & BONPL. ex FLÜGGE (POACEAE), com diferentes tipos de ploidia**. 2014. 71 p. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407- 4414, 1995.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; DOYLE, J. J. (Eds.), **Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing**. New York: Kluwer, 1998. p. 43-86.

ZAWKO, G. et al. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). **Molecular Ecology**, v. 10, n. 10, p. 2389-2396, 2001.

ZHAO, X.; SUN, W. Abnormalities in sexual development and pollinator limitation in *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic to Southeast Yunnan, China. **Flora**, v. 204, n. 6, p. 463-470, 2009.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) – Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para America del Sur Austral. (Argentina, Bolivia, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 102, p. 1-297, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Detalhe da inflorescência de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls, no município de Santa Maria, RS (Fonte: Prof^ª Liliana Essi).



APÊNDICE B – Detalhe da base das folhas de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls em casa de vegetação, com bainhas contendo tricomas pulgentes e decíduos, oriundas do município de São Martinho da Serra, RS (Fonte: Acervo pessoal).



APÊNDICE C - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer* F4).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	1800-450	10	1	55,56	1,111	1,387	0,326	0,222
São Martinho da Serra	1800-600	7	0	38,89	0,778	1,311	0,248	0,173
Campestre da Serra	2500-450	12	2	66,67	1,333	1,383	0,350	0,231
Vacaria	2500-450	5	0	27,78	0,556	1,222	0,177	0,123
Média				47,22	0,944	1,326	0,275	0,187

*P (porcentagem de loci polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

APÊNDICE D - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer* i.5).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	2000-250	15	1	57,69	1,154	1,345	0,312	0,207
São Martinho da Serra	2000-250	14	2	57,69	1,154	1,224	0,244	0,151
Campestre da Serra	1800-300	15	4	65,38	1,308	1,323	0,309	0,200
Média				60,25	1,205	1,297	0,288	0,186

*P (porcentagem de loci polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

APÊNDICE E - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer* O4).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	3050-300	12	2	57,14	1,143	1,360	0,309	0,208
São Martinho da Serra	1100-400	8	1	38,10	0,762	1,268	0,233	0,161
Campestre da Serra	3050-480	16	7	76,19	1,524	1,383	0,367	0,239
Média				57,14	1,143	1,343	0,303	0,202

*P (porcentagem de *loci* polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

APÊNDICE F - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer* P3).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	2100-300	14	1	53,85	1,077	1,340	0,303	0,203
São Martinho da Serra	2500-500	21	5	80,77	1,615	1,446	0,409	0,269
Campestre da Serra	2000-250	17	1	65,38	1,308	1,373	0,323	0,214
Vacaria	1250-300	9	0	30,77	0,654	1,246	0,196	0,137
Média				57,69	1,163	1,351	0,308	0,206

*P (porcentagem de *loci* polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

APÊNDICE G - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer P4*).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	4000-600	7	0	43,75	0,875	1,291	0,251	0,170
São Martinho da Serra	2000-500	5	1	31,25	0,625	1,263	0,200	0,141
Campestre da Serra	5000-300	15	7	93,75	1,875	1,481	0,438	0,268
Média				56,25	1,125	1,345	0,296	0,199

*P (porcentagem de *loci* polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).

APÊNDICE H - Tabela com a comparação de diversidade genética entre quatro populações de *Paspalum rawitscheri* (Parodi) Chase ex G.H. Rua & Valls (*primer P7*).

População	Tamanho (pb)	Total de bandas	Bandas privadas	P (%)	Na	Ne	I	h
Santa Maria	3000-500	8	0	33,33	0,667	1,251	0,203	0,140
São Martinho da Serra	3000-300	19	7	79,71	1,583	1,357	0,357	0,227
Campestre da Serra	2250-300	9	0	37,50	0,750	1,252	0,216	0,147
Média				50,00	1,000	1,287	0,259	0,171

*P (porcentagem de *loci* polimórficos); Na (número de alelos diferentes); Ne (número efetivo de alelos); I (índice de Shannon); h (diversidade genética).