



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANILO MASSUIA ROCHA

**DEGENERAÇÃO NUCLEAR DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO GRÃO DE PÓLEN EM  
*Rhynchospora breviuscula* H. PFEIFF (CYPERACEAE)**

---

Londrina  
2015

DANILO MASSUIA ROCHA

**DEGENERAÇÃO NUCLEAR DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO DO GRÃO DE PÓLEN EM  
*Rhynchospora breviscula* H. PFEIFF (CYPERACEAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. André Luís Laforga Vanzela.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central  
da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R672d Rocha, Danilo Massuia.

Degeneração nuclear durante o desenvolvimento do grão de pólen em *Rhynchospora breviscula* H. Pfeiff (Cyperaceae) / Danilo Massuia Rocha. – Londrina, 2015.  
52 f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Cyperaceae – Teses. 2. Angiosperma – Teses. 3. Células – Núcleo – Teses. 4. Degeneração – Teses. 5. Citogenética vegetal – Teses. I. Vanzela, André Luis Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 582.542.2

DANILO MASSUIA ROCHA

**DEGENERAÇÃO NUCLEAR DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO  
GRÃO DE PÓLEN EM *Rhynchospora breviuscula* H. PFEIFF  
(CYPERACEAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. André Luís Laforga Vanzela  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Jorge Ernesto de Araújo Mariath  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul -  
UFRGS

---

Profa. Celia Guadalupe Tardeli de Jesus  
Andrade  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de março de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha família por todo apoio me dado durante a minha vida.

Ao meu orientador André Luís Laforga Vanzela pela orientação, paciência e amizade.

A professora Celia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, pela contribuição tanto neste trabalho quanto para minha formação.

Ao professor Jorge Ernesto de Araújo Mariath por gentilmente ter aceito compor minha banca examinadora e contribuir com a melhoria deste trabalho.

Aos meus amigos de LCDV: Joana Baldissera, Renata de Castro, Thiago Fernandes, Adriano de Paula e Vanessa Bardella pelo companheirismo e ajuda durante o meu mestrado.

Às fontes de fomento: CAPES, CNPQ, Fundação Araucária e ProPPG-UEL, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Mestrado em Genética Molecular.

À minha segunda família: Raquel Bastos, Lucas Johan, Fernanda Nogueira, Luciana Gama, Marcos Yamada, Fátima Arcanjo, Mariana Pires, Eloá Castro, Carina Bomediano, Marcus Navarro, Otávio Reis Pereira e Leandro Fazzano e tantos outros por tudo.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

ROCHA, Danilo Massuia. **Degeneração nuclear durante o desenvolvimento do grão de pólen em *Rhynchospora breviuscula* H. Pfeiff (Cyperaceae)**. 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

A microsporogênese em Cyperaceae é marcada pela formação de pseudomônades, em que um núcleo permanece no centro da célula enquanto os demais migram para uma das extremidades, são separados por parede, tornam-se sucessivamente menores e eventualmente são abortados. Este trabalho buscou investigar os componentes celulares dessa estrutura, PCD e possível perda de material genético nas células degenerativas em *Rhynchospora breviuscula*. Anteras foram processadas de diferentes maneiras para microscopia de luz. Foi estudado o comportamento de elementos do citoesqueleto por microscopia de luz e citoquímica. Elementos repetitivos de DNA foram localizados por FISH para entender seu comportamento no processo de degeneração, que também foi avaliado por citometria de fluxo. Em *R. breviuscula*, células degenerativas encontram-se no polo abaxial e apresentam-se funcionais até estágios tardios de desenvolvimento. Actina-F foi depositada regularmente na placa celular na meiose e PM I. Contudo, células tratadas com colchicina apresentaram quatro a cinco núcleos similares aos degenerativos na região central-abaxial, indicando a necessidade do fragmoplasto na manutenção de um produto funcional cuja seleção não seria estocástica. Sinais de hibridização dos elementos Tyba-SatDNA e gypsy-like diminuem de acordo com a perda global de cromatina, enquanto copia-like apresenta uma diminuição mais acentuada. Possivelmente esta diferença esteja relacionada à diferente distribuição desses grupos nos cromossomos: Tyba é um satDNA típico de centrômeros enquanto gypsy-like e copia-like possuem distribuição dispersa, sendo o último encontrado em regiões de cromocentro. A perda de material genético foi confirmada por citometria de fluxo.

**Palavras-chave:** Cyperaceae. Angiosperma. Células - Núcleo. Degeneração. Citogenética vegetal.

ROCHA, Danilo Massuia. **Degeneration nuclear during of the development of the grain of pollen in *Rhynchospora breviuscula* H. Pfeiff (Cyperaceae)**. 2015. 53 p. Dissertation (Master degree in Genetic and Molecular Biology), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

Microsporogenesis in Cyperaceae is marked by pseudomonad formation, in which one nucleus remains in the center of the cell while three other migrate to one end, are separated by cell wall, become successively smaller and ultimately are aborted. This study aimed to investigate the cellular components of this structure, PCD and possible loss of genetic material in degenerative cells, in *Rhynchospora breviuscula*. Anthers were processed in different ways for light microscopy. Behavior of cytoskeleton elements was studied by light microscopy and cytochemistry. Elements of repetitive DNA were located by FISH to understand their behavior in the degeneration process, which was also measured by flow cytometry. In *R. breviuscula*, degenerative cells are located in the abaxial pole and are functional until late stages of development. F-actin was deposited regularly in the cell plate during meiosis and PM I. However, cells treated with colchicine presented four to five nuclei in the abaxial region, morphologically similar to the degenerative ones, indicating the phragmoplast role on the maintenance of a functional product whose selection would not be stochastic. FISH indicated that Tyba-SatDNA and gypsy-like hybridization signs decrease according to nuclear size reduction, while copia-like present relatively sharper decrease. This difference is possibly due to the way these different repetitive DNA are organized in chromosomes: Tyba is a typical centromeric satDNA, while gypsy-like and copia-like present disperse distribution, the last being present in chromocenter regions. Loss of genetic material was confirmed by flow cytometry.

**Keywords:** Cyperaceae. Degeneration. Angiosperm. Nucleus (Cells). Plant cytogenetics.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Morfologia de anteras de *R. breviscula* durante quatro estágios do desenvolvimento. Cortes transversais semifinos corados com azul de toluidina. **(a)** No primeiro estágio de desenvolvimento todos os tecidos típicos da antera podem ser observados: epiderme (Ep), endotécio (En), camada média (Md), tapete (T) e tecido esporogênico composto por células mãe de micrósporo (MMC). Tapete e camada média não apresentam sinais de PCD. **(b)** Note que, durante a prófase I da MMC, o citoplasma das células do tapete e da camada média aparece mais corado (setas). Um idioblasto pode ser observado na epiderme (\*). **(c)** Depois da meiose, a camada média não pode mais ser distinguida, e as células do tapete apresentam sinais avançados de PCD (setas). Note dois núcleos degenerativos na pseudomônade (DN). **(d)** Em estágios tardios de desenvolvimento, apenas epiderme e endotécio podem ser observados. Detritos das células do tapete podem ser vistos próximos da parede da antera (setas). Células degenerativas (DC) de pseudomônades vizinhas exibem diferentes estágios de PCD. Célula generativa (GC) e núcleo vegetativo (VN) são evidentes nesse estágio em uma das pseudomônades. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .....30

**Figura 2** - Desenvolvimento de pseudomônades em *R. breviscula*. **(a-e-i)** Cortes transversais semifinos de anteras corados com azul de toluidina **(b-c-f-g-j-k)**. Pseudomônades esmagadas coradas com  $\text{Ag}(\text{NO})_3$ . **(d-h-l)**. Pseudomônades esmagadas coradas com Alexander. As anteras à direita representam os estágios de desenvolvimento da pseudomônade à esquerda que podem ser encontradas. **(a)** Dois núcleos degenerativos (DN) no polo abaxial e um núcleo funcional (FN) no centro podem ser vistos. **(b)** Fim da telófase II. Note um grupo de núcleos amarelados com nucléolos evidentes localizado na região central-abaxial da MMC. A seta aponta para o núcleo levemente deslocado. **(c)** Pseudomônade jovem com três núcleos degenerativos menores (DN) na região abaxial e um núcleo funcional maior (FN) na região central. **(d)** Observe que, ao final da telófase II, dois domínios funcionais similares estão presentes (setas). **(e)** Final da PM I. Note a presença da célula generativa (GC) no centro da pseudomônade. O núcleo vegetativo pode ser visto fracamente corado na região adaxial (VN). Células degenerativas também estão presentes (DC). **(f e g)** Pseudomônades antes e depois da PM I. Três núcleos degenerativos menores (DN) com nucléolos ativos podem ser vistos. Observe o núcleo funcional (FN) em **(f)** e o núcleo generativo (GN) ao centro e vegetativo (VN) na região adaxial em **(g)**. **(h)** Durante esse estágio, dois domínios citoplasmáticos podem ser observados: i) o domínio abaxial reduzido (domínio degenerativo, dd) e ii) domínio adaxial maior (domínio funcional, FD) com vários vacúolos (setas). **(i)** Grão de pólen imaturo com células degenerativas em morte celular (PCD). Célula generativa (GC) encontra-se localizada ao lado do núcleo vegetativo fracamente corado (VN). Nesse estágio, os núcleos degenerativos apresentam sinais de degeneração (PCD) **(j)** ou estão ausentes **(k)**. Núcleo generativo (GN) e vegetativo (VN) estão presentes. **(l)** Note que,

nesse estágio, apenas detritos do domínio degenerativo (dd) podem ser observado na região abaxial. O domínio funcional (FD) na região abaxial apresenta aspecto condensado sem vacúolos. Barra de escala = 10 µm .....31

**Figura 3** - Comportamento do citoesqueleto em pseudomônades de *R. breviscula*. **(a-c)** Detecção de Actina-F por Faloidina-FITC (verde) e núcleos contracorados com DAPI (azul). Núcleos degenerativos (DN) localizados na região abaxial. **(d-f)** Despolimerização de microtúbulos com colchicina. Núcleos corados com DAPI. **(a)** Final da telófase II – tétrade assimétrica. Note sinais de FITC na região central-abaxial, sendo estes mais intensos (setas) entre os núcleos degenerativos e o funcional (FN). **(b)** Pseudomônades sem sinais evidentes de Faloidina-FITC entre os núcleos degenerativos e funcional (FN), apenas com sinais pouco mais intensos na região adaxial (seta). **(c)** Final da PM I. Observe uma abundância de sinais de FITC (setas) entre os núcleos generativo (GN) e vegetativo (VN). **(d, e)** Note a célula cenocítica com quatro a cinco núcleos morfológicamente parecidos na região central-abaxial **(d)**, abaxial **(e)** e ao longo da célula **(f)**. Observe também que esses núcleos muito se aparentam com os degenerativos de pseudomônades regulares nas figuras **(a-c)**. **(f)** Célula cenocítica com cinco núcleos possivelmente em degeneração. Barra de escala = 10 µm.....32

**Figura 4** - Sequências de DNA repetitivo utilizadas no desenho de *primers* (sublinhados). O primeiro elemento, Tyba-SatDNA, representa um DNA satélite com 171 pares de base (pb) previamente descrito em *R. pubera*, uma espécie próxima de *R. breviscula*. O segundo elemento, *Rb-Copia*, com 250 pb, possui identidade próxima com a transcriptase reversa de um *Ty1-copia* LTR descrito em *Eleocharis palustris*. O terceiro, *Rb-Gypsy*, representa um elemento relacionado a um *Ty3-gypsy* LTR-RT de *Oryza sativa*.....33

**Figura 5** – Hibridização *in situ* fluorescente em *R. breviscula* usando sondas de DNAr 45S e Tyba-SatDNA. **(a)** FISH com sondas de DNAr 45S marcadas com digoxigenina (vermelho). Núcleos corados com DAPI (azul). Setas apontam para os núcleos com dois sinais de hibridização. **(b)** Núcleo interfásico de tecidos somáticos corado com DAPI (azul). **(c)** Sinais de hibridização de sondas de Tyba-SatDNA marcadas com biotina (verde) distribuídos por todo o núcleo (vermelho). **(d)** Oito dos dez cromossomos de uma célula somática podem ser vistos com corados com DAPI (azul). **(e)** Sinais de hibridização para sondas de Tyba-SatDNA (setas). **(f)** Note que esses sinais (verde) aparecem localizados por toda extensão do cromossomo holocinético (vermelho). **(g)** Cinco cromossomos meióticos podem ser observados corados com DAPI (azul). **(h)** Sinais de hibridização para sondas de Tyba-SatDNA podem ser vistos (verde). O padrão desses sinais é diferente do que aqueles encontrados em cromossomos somáticos, devido ao seu aspecto diferente. **(i)** Pseudomônades de *R. breviscula* coradas com DAPI (azul). Três núcleos degenerativos podem ser vistos no domínio degenerativo com aspecto condensado (dd), enquanto um núcleo maior e descondensado aparece no domínio funcional (FD). **(j)** Quando sondas de Tyba-SatDNA são usadas para a FISH em pseudomônades (verde), os

núcleos degenerativos aparecem com sinais de hibridização mais intensos comparado ao núcleo funcional, provavelmente devido ao diferente estado de condensação da cromatina. **(k)** Pseudomônades em PM I coradas com DAPI (azul) e **(l)** FISH usando sondas de Tyba-SatDNA no mesmo estágio mostrando o mesmo perfil de hibridização observado em cromossomos meióticos. Também observe que nesse estágio os cromossomos do domínio degenerativo (dd) aparecem menores do que aqueles no domínio funcional (FD). **(m)** Note também que não há diferença visível na intensidade dos sinais de hibridização, em verde, entre os cromossomos do domínio degenerativo (dd) e funcional (FD), em vermelho. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .....34

**Figura 6** – Hibridização *in situ* fluorescente em *R. brevisuscula* usando sondas de *Rb-Copia*. **(a)** Núcleo interfásico de tecido somático corado com DAPI (azul) e **(b)** sinais de hibridização (verde) mostram que sondas de *Rb-Copia* marcadas com biotina acumulam-se em regiões específicas do núcleo. **(c)** Note que os sinais de FISH (verde) são localizados em regiões de cromocentro do núcleo (vermelho). **(d)** Três cromossomos de uma célula somática podem ser vistos corados com DAPI com seus respectivos sinais de hibridização **(e)**. Note que sondas de *Rb-Copia* (verde) estão localizados predominantemente nas extremidades heterocromáticas do cromossomo **(f)**, que provavelmente correspondem com as regiões de cromocentro detectadas no núcleo interfásico. **(g)** FISH em pseudomônades apresentam um cenário similar aquele observado usando sondas de Tyba-SatDNA: três núcleos degenerativos (vermelho) apresentam aspecto condensado e sinais de hibridização intensos (verde) no domínio degenerativo (dd), enquanto um núcleo funcional (vermelho), grande e descondensado no domínio funcional (FD), mostra sinais menos intensos. Detalhe mostra novamente sinais de FISH de sondas *Rb-Copia* localizadas em regiões de cromocentro do núcleo interfásico, corado com DAPI (azul). O cenário muda durante a MP I. Em **(h)**, uma captura superexposta mostra que os cromossomos do domínio degenerativo em vermelho (dd) apresentam muito menos sinais de FISH (verde) comparado com os cromossomos do domínio funcional, também em vermelho (FD). Note também que os cromossomos do domínio degenerativo (dd) são muito menores que aqueles do domínio funcional (FD). Figura **(i)** mostra novamente pseudomônades em PM I coradas com DAPI (azul) e em **(j)** são vistos os sinais de FISH em exposição normal (verde). Setas apontam para os cromossomos da célula funcional. A figura **(k)** mostra a figura mesclada, com cromossomos (vermelho) no domínio funcional (FD) apresentando sinais de hibridização (verde) mais intensos em relação aqueles localizados no domínio degenerativo. Barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ .....36

**Figura 7** – Hibridização *in situ* fluorescente em *R. brevisuscula* usando sondas de *Rb-Gypsy*. **(a)** Pseudomônades em PM I coradas com DAPI (azul) e **(b)** Sinais de FISH para sondas de *Rb-Gypsy* marcadas com biotina no mesmo estágio (verde), com setas apontando para os cromossomos da célula funcional. Note novamente que os cromossomos do domínio funcional (FD) são significativamente maiores do que aqueles localizados no domínio degenerativo (dd). **(c)** Observe na imagem mesclada que não há diferença na intensidade de sinais de hibridização (verde) nos cromossomos dos

domínios funcional e degenerativo (vermelho). **(F1)** e **(F2)** mostram detalhe de dois cromossomos domínio funcional (FD) marcados com sinais de FISH nas extremidades. **(D1)** e **(D2)** Mostram os seus correspondentes no domínio degenerativo (dd), com tamanhos menores mas sinais proeminentes nas extremidades. **(d)** Núcleo interfásico de uma célula somática corado com DAPI (azul). **(e)** Sinais de FISH (verde) indicam que, como *Rb-Copia*, essa sonda acumula-se em regiões específicas do núcleo. Entretanto, **(f)** mostra que, diferente de *Rb-Copia*, esses sinais (verde) aparecem adjacente as regiões de cromocentro do núcleo (vermelho). Barra de escala = 10  $\mu$ m.....38

**Figura 8** – Citometria de fluxo. **(a)** Citometria de fluxo em tecidos de folha de *R. breviscula* e *R. pubera*. Dois picos podem ser observados: um com  $1,56 \times 10^5$  unidades fluorescentes representando núcleos 2C de *R. pubera*, que possuem um valor conhecido de 3,53 pg. O segundo pico, com  $3,77 \times 10^4$  unidades fluorescentes, representa núcleos 2C de *R. breviscula*. Baseado no valor de fluorescência de núcleos de *R. pubera*, pode-se concluir que o valor genômico de *R. breviscula* é  $2C = 0,85$  pg. **(b)**. Citometria de fluxo em pseudomônades de *R. breviscula*. Note que o pico 2C pode ser observado novamente e ao lado dele outro pico é visto com  $2,06 \times 10^4$  unidades fluorescentes, representando núcleos haploides com  $C = 0,46$  pg. Um grande pico heterogêneo também é observado, representando uma diversa população de núcleos com valores C menores que 0,46 pg. **(c)** Esse grande e heterogêneo pico representa uma população de núcleos com valores C entre 0,38 pg e 0,18 pg.....40

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Todas as medidas feitas em citometria de fluxo. RP = Núcleos diploides de tecido de folha de *Rhynchospora pubera*. RB = Núcleos diploides de tecido de folha *Rhynchospora breviuscula*. 2C = Núcleos diploides de pseudomônades de *R. breviuscula*. C = Núcleos haploides de pseudomônades de *R. breviuscula*. D(total) = Medida de toda a população de núcleos degenerativos. D0 – D5= Medidas feitas em cinco estágios diferentes de degeneração.....42

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>15</b>
1.1. REPRODUÇÃO EM ANGIOSPERMAS.....	15
1.2. MICROSPOROGÊNESE E MICROGAMETOGÊNESE EM ANGIOSPERMAS.....	15
1.3. MICROSPOROGÊNESE E MICROGAMETOGÊNESE EM CYPERACEAE.....	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. GERAL.....	20
2.2. ESPECÍFICOS.....	20
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>21</b>
3.1. ABSTRACT.....	21
3.2. INTRODUCTION.....	22
3.3. MATERIAL AND METHODS.....	23
3.4. RESULTS.....	25
3.5. DISCUSSION.....	43
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho encontra-se dividido em três partes. A primeira faz uma introdução sobre reprodução em angiospermas, com uma revisão da literatura sobre o desenvolvimento do gametófito masculino, trazendo a problemática da família Cyperaceae. A segunda parte traz os objetivos que guiaram a produção deste trabalho e a terceira corresponde ao artigo que será submetido à publicação. Este artigo aborda o processo de formação dos grãos de pólen, os aspectos estruturais da pseudomônade, o comportamento de elementos do citoesqueleto e os destinos dos núcleos formados na tétrade assimétrica, utilizando *Rhynchospora breviuscula* (Cyperaceae) como modelo. Neste, pudemos mostrar que a meiose assimétrica pode ser perturbada por colchicina, levando a efeitos drásticos no seu desenvolvimento. Também pudemos observar que os núcleos degenerativos tornam-se menores durante seu desenvolvimento pela aparente perda de motivos repetitivos no seu conteúdo genômico, até o momento em que são abortados por morte celular programada. Por fim, serão apresentadas as considerações finais sobre este trabalho, e, em seguida, as referências utilizadas para sua escrita.

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1. Reprodução em angiospermas**

O ciclo de vida das plantas é marcado pela alternância entre gerações haploides e diploides. A geração haploide, composta pelo indivíduo gametófito, é formada a partir dos esporos e produz gametas por mitose, em um processo chamado gametogênese. Ao se fundirem, os gametas formam a geração diploide, representada pelo indivíduo esporófito. O esporófito, por sua vez, produz esporos haploides por meiose, em um processo chamado esporogênese, completando o ciclo de vida (Mariath et al. 2006). A geração haploide nas angiospermas é muito reduzida e conta com dois indivíduos multicelulares diferentes: i) o microgametófito (também conhecido como androgametófito ou grão de pólen) e ii) megagametófito (ou ainda ginogametófito ou saco embrionário). Ambos os gametófitos desenvolvem-se no esporófito adulto (Mascarenhas 1989, Mariath et al. 2006).

### **1.2. Microsporogênese e microgametogênese em angiospermas**

O desenvolvimento do microgametófito é um processo contínuo didaticamente dividido em duas etapas. Na primeira, a microsporogênese, as células mais internas da antera diferenciam-se em células mãe de micrósporos. Estas sofrem meiose, originando quatro micrósporos isolados do tecido esporofítico por uma densa parede de calose, composta por 1,3- $\beta$ -glucana (Mascarenhas 1989). Acredita-se que a parede de calose seja importante no desenvolvimento dos micrósporos. Ela poderia, por exemplo, isolar estes do tecido esporofítico, permitindo a expressão do seu genoma haploide (Heslop-Harrison e Mackenzie 1967, Scott et al. 2004). Os micrósporos são então liberados graças à ação da enzima calase (1,3- $\beta$ -glucanase). Assim que os micrósporos são liberados da calose,

começa o depósito da parede celular do grão de pólen ou esporoderme (Mascarenhas 1989, Bedinger 1992).

Na segunda etapa, a microgametogênese, um grande vacúolo ocupa a parte central do micrósporo, e o núcleo do micrósporo é deslocado para a periferia da célula. Esse deslocamento faz com que a primeira divisão celular da microgametogênese, chamada mitose polínica I (PM I), seja assimétrica (Bedinger 1992). Dessa divisão são geradas duas células desiguais: a célula vegetativa e a generativa, formando o grão de pólen imaturo (Tanaka 1997). A célula generativa forma os gametas por uma mitose regular, chamada mitose polínica II (PM II). Em mais de 70% das angiospermas, a PM II só ocorre após a liberação do grão de pólen imaturo da antera (Mariath et al. 2006). Após a PM II, o grão de pólen maduro é formado, contendo os gametas dentro de uma célula vegetativa maior (Tanaka 1997).

A PM I é um exemplo de divisão assimétrica que gera duas células com características e destinos diferentes. A importância da assimetria na PM I foi discutida em muitos trabalhos envolvendo agentes despolimerizadores de microtúbulos, como a colchicina ou colcemide (Tanaka e Ito 1981, Zaki e Dickinson 1991, Eady et al. 1995, Tanaka 1997, Ueda et al. 2012). Segundo esses autores, a administração desses agentes durante o desenvolvimento do micrósporo faz com que a PM I, quando ocorre, origine dois núcleos iguais, que mais se assemelham ao núcleo vegetativo de grãos de pólen normais. Isso mostra o papel decisivo dos microtúbulos na diferenciação nuclear durante a microgametogênese. Para Tanaka (1997), fatores citoplasmáticos estão envolvidos na modificação da cromatina ao final da mitose. Duas moléculas reguladoras seriam sintetizadas e acumuladas no citoplasma – o fator gametofítico (GF) e o fator gamético (gf). O primeiro seria mais abundante que o segundo, que estaria presente apenas na região do núcleo generativo. O GF modificaria o núcleo central, promovendo a difusão

da cromatina e expressão de genes chamados *late pollen*, como o *lat52* (Eady et al. 1995), que marcam a diferenciação do núcleo vegetativo. O outro núcleo gerado na mitose assimétrica não é afetado pelo GF, e sim pelo gf graças a sua compartimentalização. O gf modifica também a cromatina desse núcleo, aumentando a sua condensação e ativando genes específicos de células generativas, como o *gH2A* (Ueda et al. 2012), e tornando-o então o núcleo generativo. A divisão assimétrica garantiria os diferentes destinos das diferentes células. Porém, devido à exposição à colchicina ou colcemide, as duas células agora permanecem no mesmo ambiente citoplasmático e respondem da mesma maneira aos estímulos do GF. Assim, dois núcleos com identidades similares ao núcleo vegetativo são formados (Tanaka 1997). Apesar de o modelo explicar o desenvolvimento do grão de pólen e os efeitos da colchicina na mitose assimétrica, GF e gf ainda não foram caracterizados.

### **1.3. Microsporogênese e microgametogênese em Cyperaceae**

A família Cyperaceae é conhecida por apresentar algumas características citológicas incomuns em relação às demais famílias. Uma delas é a sua microsporogênese, cuja meiose culmina em uma tétrade assimétrica de núcleos com morfologias e destinos diferentes (Brown e Lemmon 2000, San Martin et al. 2013). Um deles, o chamado núcleo funcional, continua o desenvolvimento de maneira similar a observada na maioria das angiospermas. Logo após a meiose, esse núcleo se divide de forma assimétrica gerando os núcleos vegetativo e generativo (Furness e Rudall 1999). Os outros três núcleos gerados na meiose durante a microsporogênese são confinados na periferia da célula e progressivamente diminuem de tamanho até serem completamente abortados por morte celular programada, PCD (Kirpes et al. 1996). A estrutura formada após a meiose, com três núcleos degenerativos e um funcional (ou ainda três núcleos degenerativos, núcleo generativo e núcleo vegetativo) é chamada pseudomônade

(Strandhede 1965, Furness e Rudall 1999, Brown e Lemmon 2000, Ranganath e Nagashree 2000). As pseudomônades constituem uma sinapomorfia da família Cyperaceae e são consideradas um caractere apomórfico (Kirpes et al. 1996, Furness e Rudall 2011).

Estruturalmente, a pseudomônade é caracterizada pelo seu formato piriforme, com uma porção mais larga (região abaxial) voltada para o tapete, e outra mais estreita, voltada para o lóculo da antera (região adaxial). A posição dos núcleos degenerativos e funcionais varia dentro dos gêneros da família. O núcleo funcional, por exemplo, pode aparecer voltado para a região adaxial da célula, como em *Rhynchospora* (San Martin et al. 2013), ou para a região abaxial como em *Carex* (Brown e Lemmon 2000). O porquê de existir diferentes perfis de organização na pseudomônade ainda não é conhecido, mas isso pode ser influenciado pelo posicionamento de organelas e do citoesqueleto (Brown e Lemmon 2000, Mariath et al. 2012). A meiose em Cyperaceae é marcada pela ausência de parede entre os quatro núcleos, exceto nos estágios mais avançados da microsporogênese. Desta forma, logo após a meiose, os quatro núcleos haploides encontram-se livres na célula mãe de micrósporo, possuindo o mesmo tamanho (Padhye 1968, Furness e Rudall 1999). Após esta etapa, os núcleos degenerativos são deslocados para uma das extremidades da célula e compartimentalizados, formando as células degenerativas. Durante o desenvolvimento, os núcleos das células degenerativas tornam-se gradativamente menores. O núcleo funcional compõe então a célula funcional (Kirpes et al. 1996, Brown e Lemmon, 2000, San Martin et al. 2013).

Evidências ultraestruturais mostram que a pseudomônade é dividida em dois domínios, um funcional e outro degenerativo (San Martin et al. 2013). Ambos apresentam vacúolos e organelas, sendo que o funcional diferencia-se do degenerativo por apresentar gotículas de lipídeos, encobertas ou não em camadas concêntricas de retículo

endoplasmático granular. O citoplasma das porções que envolvem os núcleos degenerativos também se apresenta mais encolhido (Mariath et al. 2012). Placas celulares responsáveis por isolar os núcleos degenerativos aparecem a partir da fusão de vesículas vindas do Golgi, ricas em pectina (San Martin et al. 2013), sendo a formação de parede entre os produtos meióticos muito atrasada em relação ao desenvolvimento padrão da microsporogênese (Hakansson 1954).

Sabe-se que a pseudomônade é resultante do deslocamento tardio do fragmoplasto por elementos do citoesqueleto (Brown e Lemmon 2000). Porém, ainda não se conhece o motivo pelo qual três dos quatro produtos da meiose são abortados durante o desenvolvimento da pseudomônade. Também não se sabe ao certo qual seria a vantagem evolutiva deste caractere que, apesar de conservado na família, remete à aparente perda de variabilidade genética em relação ao desenvolvimento padrão.

Tão pouco claro é o processo de eliminação celular que define qual dos quatro núcleos seria o funcional ou se o processo é puramente estocástico, já que não é percebida a diferença entre os núcleos haploides logo após a meiose. Apesar de serem posteriormente confinados em uma célula diminuta, esses núcleos ainda conseguem entrar em divisão, mas esta aparentemente não é completada na maioria dos casos (Ranganath e Nagashree 2000). Quando observados em interfase, esses núcleos apresentam até mesmo nucléolos, o que sugere atividade transcricional (San Martin et al. 2013). Entretanto, células degenerativas nunca geram células vegetativa e generativa, e sempre são abortadas (Ranganath e Nagashree 2000). Kirpes et al. (1996) postulou que a distância dos núcleos degenerativos em relação ao tecido do tapete pode estar envolvida com o processo de morte celular, já que este tecido é responsável pela nutrição dos meiócitos e micrósporos. Esta hipótese, porém, não pode explicar o aparecimento de núcleos degenerativos voltados para o tapete, como ocorre em *Rhynchospora* (San Martin

et al. 2013). Sugere-se também que o confinamento dos núcleos degenerativos em pequeno espaço celular desencadearia a morte celular programada (Strandhede 1973), apesar de o fato de células generativas também serem confinadas em pequenos espaços citoplasmáticos (Zaki e Dickinson 1991).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Investigar os componentes celulares envolvidos na formação da pseudomônade, bem como estudar a perda de material genético nas células degenerativas durante o desenvolvimento do grão de pólen.

### **2.2. Específicos**

- Investigar as alterações morfológicas que ocorrem no processo de formação das pseudomônades em *R. breviscula*;

- Obter o perfil de desenvolvimento das pseudomônades por análise citoquímica com nitrato de prata e corante Alexander;

- Estudar o papel de elementos do citoesqueleto na formação das pseudomônades por meio de reações citoquímica e despolimerização de microtúbulos;

- Utilizar ferramentas de bioinformática para buscar famílias de DNA repetitivo e utilizar estas sequências para entender o processo de redução no tamanho dos núcleos ao longo da degeneração;

- Localizar por hibridização *in situ* fluorescente as famílias de DNA previamente selecionadas e investigar o envolvimento dessas sequências na perda de material genético nas células degenerativas em relação ao núcleo funcional.

### 3. ARTIGO

#### **Developmental PCD in pseudomonads of *Rhynchospora breviuscula* (Cyperaceae): a mechanism associated with possible nuclei selection and decrease of repetitive DNA content.**

Danilo Massuia Rocha<sup>1</sup>, André Luís Laforga Vanzela<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

\* Address for correspondence: E-mail: andrevanzela@uel.br

**3.1. Abstract** Microsporogenesis in Cyperaceae is characterized by the formation of an asymmetrical tetrad named pseudomonad, with a functional nucleus and three degenerative nuclei. In this study we investigated the cellular components, cell death and loss of genetic material in the microsporogenesis of *Rhynchospora breviuscula*. Anthers were fixed and processed in several ways for light microscopy. Degenerative cells are located in the abaxial pole and present functional nucleoli and cytoplasm until late stages of development. Detection of F-Actin using Phalloidin-FITC, as well as the treatment of anthers with colchicine demonstrated that cell plate is important in the maintenance of asymmetric meiosis, which would guaranty that one product undergoes regular gametogenesis in a non-stochastic way. In addition, data suggest other differentiation pathways for generative and vegetative nuclei. Repetitive DNA sequences were localized by FISH in order to detect their role in the loss of genetic material in degenerative cells,

showing a differential behavior of repetitive DNA sequences decrease in this process. Loss of genetic material was also confirmed by flow cytometry.

**Keywords** Asymmetric tetrad · Colchicine · Phragmoplast · Cell plate · FISH · Flow cytometry

### 3.2. Introduction

Microsporogenesis in Cyperaceae Juss. family displays divergent morphological traits compared to angiosperms in general. After meiosis, the tetrad exhibits four nuclei in a coenocytic wedge shaped cell (Simpson et al. 2003), with a functional nucleus occupying the center of the cell, and other three located on narrower or broader apex. The latter are separated by wall formation and ultimately degenerate (Maheshwari 1950, Brown and Lemmon 2000, San Martin et al. 2013). The structure formed is known as pseudomonad (Strandhede 1965) and, while it is not exclusive of this family (Furness and Rudall 2011), it is considered a synapomorphy (Kirpes et al. 1996, Coan et al. 2010).

The functional cell of pseudomonads undergoes an asymmetric mitosis as standard, known as pollen mitosis I (PM I), originating the generative and vegetative cells (Ranganath and Nagashree 2000). The degenerative cells may initiate division, but in almost all cases, it is soon arrested (Maheshwari 1950, Ranganath and Nagashree 2000). During development, they become successively smaller, until they are completely aborted by programmed cell death, PCD (Shivanna and Johri 1985, Kirpes et al. 1996, Coan et al. 2010, Ranganath and Nagashree 2000, San Martin et al. 2013).

Pseudomonads of Cyperaceae represent an exciting model for studies of cell symmetry associated with PCD. However, there are some gaps in knowledge of the molecular mechanisms involved its formation, including: the global organization and

displacement of phragmoplast, role of cell plate on isolating cytoplasmic environments (functional and degenerative), mechanisms of PCD and the evolutionary meaning of genetic variability loss provoked by nuclei degeneration. Keeping this in view, the aim of this study was to investigate these events using *Rhynchospora breviuscula* H. PFEIFF (Cyperaceae) as a model.

### 3.3. Material and methods

*Plant Material.* Twelve individuals of *R. breviuscula* were collected in Iporanga, Sao Paulo, Brazil and kept in a greenhouse of Laboratory of Cytogenetics and Plant Diversity (LCDV), in State University of Londrina, Brazil.

*Light Microscopy.* Anthers were processed in different protocols for light microscopy: 1) Samples were fixed in a modified Karnovsky solution (Karnovsky 1965) 2,5% glutaraldehyde and 2,5% paraformaldehyde in 0.1M cacodilate buffer (pH 7.2) and post-fixed in 1% osmium tetroxide. The material was then dehydrated in a graded ethanol series, processed through propylene oxide and embedded in Araldite resin®. Semi-thin sections were stained with 2% Toluidine blue O in sodium borate buffer (O'Brien e McCully, 1981). 2) Anthers were fixed in absolute ethanol:glacial acetic acid (3:1, v:v) and kept at -20 °C until use. Samples were washed in distilled water, treated with 50% Ag(NO)<sub>3</sub> for 12 hours at 60 °C, washed in distilled water again and dissected in 45% acetic acid. Coverslips were removed after freezing in liquid nitrogen and slides were mounted using Entellan (Merck). 3) Anthers were directly dissected in 1% Alexander stain (Alexander 1969), and prepared as semi-permanent slides.

*F-Actin detection with FITC-Phalloidin.* Anthers were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS 1× for one hour, washed in PBS 1× and digested in enzymatic solution containing 2% cellulase, 20% pectinase and 2% lyticase (v:w:v). Material was

dissected in PBS 1×. Coverslips were removed after freezing in liquid nitrogen. Slides were treated with 5% FITC-Phalloidin and DAPI 2 µg/mL, and mounted using Antifade solution (25 µL) composed of DABCO [1,4-diaza-bicyclo(2.2.2)-octane (2.3%), 20 mM Tris HCl pH 8, (2%) and glycerol (90%), in distilled water].

*Colchicine treatment.* Inflorescences were treated with a drop of a 0.5% agarose gel plus 0.05% colchicine for 48 hours in room temperature and protected from light. For each treatment, a control was made without colchicine. Anthers were collected and fixed in absolute ethanol:glacial acetic acid (3:1, v:v) and stored at -20°C until use. Samples were digested in enzymatic solution as previously described and dissected in 45% acetic acid. After coverslips removal in liquid nitrogen, slides were stained with DAPI 2 µg/mL and mounted in Antifade.

*Search for repetitive DNA families.* Several tools were used to search for repetitive DNA sequences related to *Rhynchospora* genera, Cyperaceae family or Poales order, such as RepFind ([http://cagt.bu.edu/page/REPFIND\\_submit](http://cagt.bu.edu/page/REPFIND_submit)), Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) and Censor/Giri (<http://www.girinst.org/censor/>). Primers were designed using Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

*Fluorescent in situ hybridization.* Slides were prepared by dissection of anthers previously fixed in ethanol:glacial acetic acid (v:v) and digested in enzymatic solution as previously described in a drop of 45% acetic acid. Coverslips were removed after freezing in liquid nitrogen. Probes of Tyba-SatDNA (Satellite DNA) and *Rb-Copia* (LTR Retrotransposon) were labeled by PCR using biotin-16-dUTP. The pTa71 clone containing 9kb *EcoRI* 45S fragment of *Triticum aestivum* (Gerlach and Bedbrook 1979) was isolated by Mini-prep and labeled with digoxigenin-11-dUTP by nick translation. For FISH, a mixture of 30 µL containing 100% formamide (15 µL), 50% polyethylene glycol

(6  $\mu$ L), 20 $\times$  SSC (3  $\mu$ L), 100 ng of calf thymus DNA (1  $\mu$ L), 10% SDS (1  $\mu$ L) and 100 ng of probe (4  $\mu$ L), was treated at 70  $^{\circ}$ C for 10 min, placed on ice and immediately applied to the samples. Denaturation/hybridization was performed at 95  $^{\circ}$ C, 50  $^{\circ}$ C and 38  $^{\circ}$ C, ten minutes each, followed by 37  $^{\circ}$ C overnight in a humidified chamber. Post-hybridization washes were carried out in 6 $\times$  SSC and 4 $\times$  SSC/0,2% Tween 20. Probes labeled with biotin were detected with avidin-FITC, while those labeled digoxigenin were detected with anti-dig-rhodamine. Post detection washes were carried out in 4 $\times$ SSC/0,2% Tween 20 at room temperature. Slides were mounted in 23  $\mu$ L Antifade solution described above, 1  $\mu$ L DAPI and 1  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>.

*Flow cytometry.* For control experiments, young leaf tissue of *R. breviscula* and *R. pubera* (2C = 3,53pg, Marques *et al.* 2015, submitted) was chopped in a petri dish above ice in modified LB01 buffer containing 15 mM TRIS, 5 mM EDTA, 80 mM KCL, 20 mM NaCL, 0,01%  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 mM MgCl<sub>2</sub> and 0,05% PVP (w/v). After chopping, samples were briefly submitted to a vortex and passed through a 50  $\mu$ m filter. After treatment with RNase 50 $\mu$ g/mL, samples were stained with propidium iodide 50 $\mu$ g/mL and analyzed in a BC Accuri C6 flow cytometer, following the specifications of the manufacturer. For pseudomonad nuclei analysis, anthers were dissected in modified LB01 buffer described above. Anther wall tissues were removed and the pseudomonad suspension was collected. Samples were then processed as described above.

### 3.4. Results

*Pseudomonad development.* Young anthers of *R. breviscula* were composed by five single layered tissues: epidermis, endothecium, middle layer, tapetum and sporogenic tissue, the latter composed of microspore mother cells, MMC (Fig. 1). Pollen grain

development was observed through different techniques. Pseudomonads presented degenerative nuclei in the abaxial region, while functional nucleus was located in the center of the cell (Fig. 2a). By the end of meiosis, four apparently equal nuclei in a somewhat symmetric arrangement were observed, with one nucleus slightly displaced to the central region of the pseudomonad (Fig. 2b). In this stage, the cytoplasm was weakly stained by silver nitrate and cell wall was inconspicuous. Some pseudomonads in this same stage presented a higher polarized arrangement. In this case, functional nucleus was already larger than the degenerative ones (Fig. 2c). Alexander stain revealed that, by the end of telophase II, two cytoplasmic domains with similar sizes were present (Fig. 2d). In latter stages, pseudomonads displayed an even higher degree of polarization. Degenerative nuclei were smaller, well stained by toluidine blue and easily distinguished from the large, weakly stained functional one (Fig. 2e). From this stage on cytoplasm, nucleus and nucleolus were well stained by silver nitrate, and exine wall was conspicuous (Fig. 2f). After PM I, two nuclei were seen in the functional region: the generative nucleus, located in the center, and the vegetative nucleus, located in the adaxial region. In this stage, the degenerative nuclei were still present in the pseudomonad and displayed active nucleoli (Fig. 2g). By the time the functional nucleus undergoes PM I, Alexander stain revealed two unequal cytoplasmic domains: a smaller one in the abaxial region, the degenerative domain, and a larger one filled with vacuoles in the adaxial region, the functional domain (Fig. 2h). In late stages of pollen development generative cell was adjacent to the vegetative nucleus, which was still weakly stained by toluidine blue (Fig. 2i). Degenerative cells were observed in PCD in the abaxial region (Fig. 2i and j) or were absent (Fig. 2k). Alexander stain revealed only one large cytoplasmic domain in the adaxial region, and cellular debris in the abaxial region (Fig. 2l).

*F-Actin detection.* After telophase II, FITC-Phalloidin signals appeared as an agglomerate corresponding to F-Actin between functional and degenerative nuclei, marking the phragmoplast portion responsible for the asymmetric tetrad (Fig. 3a). Still in early stages of pseudomonad development, F-Actin was not detectable except for a discrete accumulation in the adaxial region (Fig. 3b). F-Actin appeared again as an agglomerate after PM I, located between generative and vegetative cells (Fig. 3c).

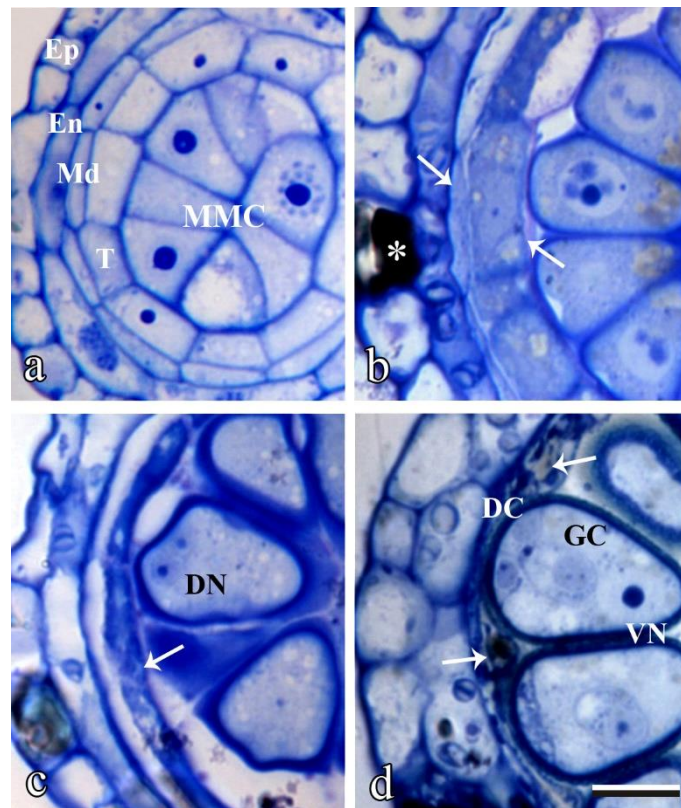
*Microtubule depolarization.* The treatment of anthers with colchicine showed that from 358 cells analyzed, 67 (18%) exhibited morphological features related to pseudomonad disruption, due to phragmoplast disorganization. These cells presented four (Fig. 3d) to five (Fig. 3e) morphologically similar nuclei, close to one another, in the abaxial to central region of the coenocytic-like cell. All nuclei appeared more condensed, similar to the degenerative nuclei of control pseudomonads, and, sometimes, highly disorganized, exhibiting features of degeneration (Fig. 3f).

*Fluorescent in situ hybridization.* 45S DNA probes labeled by nick translation used for FISH in *R. brevisuscula* pseudomonads showed one or two hybridization signals for each haploid nucleus, in both functional and degenerative cells. Differences in the signal intensity were not detected (Fig. 5a). As for Tyba-SatDNA, probes appeared randomly dispersed throughout the interphase somatic nucleus (Fig 5b and c). During somatic mitosis, probes of Tyba-SatDNA revealed that this satellite DNA is located in a somewhat linear way in the entire length of the holokinetic chromosome (Fig 5d, e and f). However, in during meiosis, chromosomes presented even further condensation aspect, and hybridization signals for Tyba-SatDNA probed were randomly scattered it (Fig 5g and f). FISH in pseudomonads using Tyba-SatDNA probe showed intense signs of hybridization

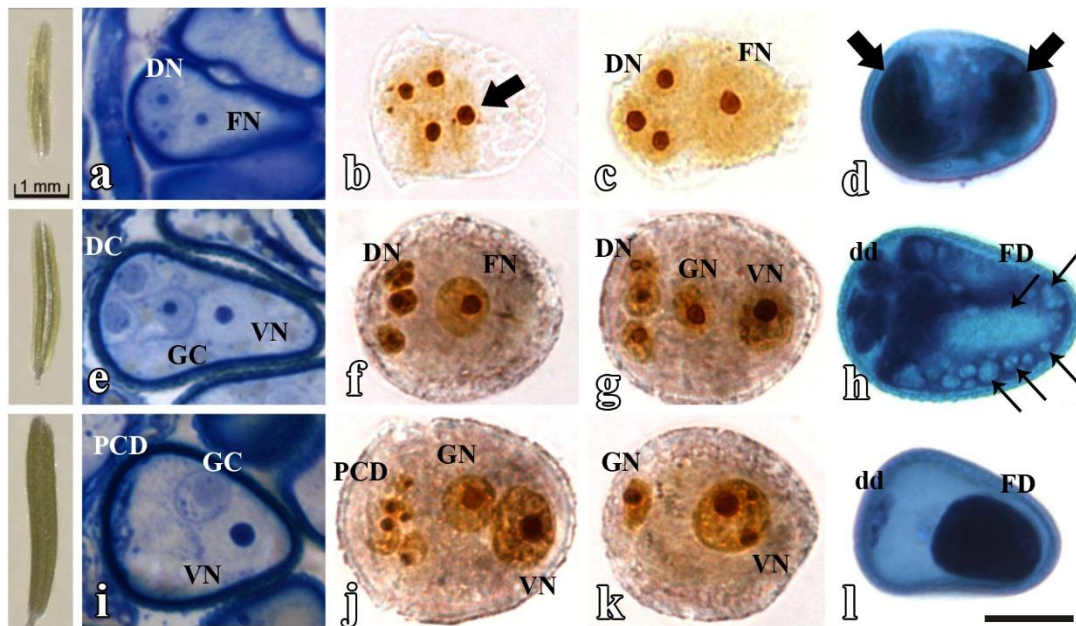
in the degenerative nuclei of the pseudomonad (Fig 5i and j). However, in PM I there was no difference in the intensity of the signals. (Fig. 5k, l and m). *Rb-Copia* probes showed different hybridization signal profiles when compared to Tyba-SatDNA. In interphase somatic nuclei, signals were more prominent in chromocenter regions (Fig 6a, b and c), and during somatic mitosis, signals were more intense in the ends of the chromosomes. When *Rb-Copia* probed were used for FISH in pseudomonads, degenerative nuclei also showed more intense signs (Figure 6g). On the other hand, in PM I, there was a visible difference in the sign intensity in the degenerative domain, with chromosomes having much less signals than those in the functional one. Again, chromosomes in the degenerative cells are considerably smaller than those found in the functional cell (Fig. 6h, i, j and k). Similar to Tyba-SatDNA, *Rb-Gypsy* probed showed no intensity signals between chromosomes from the degenerative and functional domains. However, signals for *Rb-Gypsy* probes were clearly located prominently at the ends of the chromosomes, similarly to *Rb-Copia* probes (Fig 7a, b and c). In interphase nuclei, however, *Rb-Gypsy* probes showed a slightly different hybridization profile compared to *Rb-Copia*. This time, FISH signals were located adjacent to chromocenter regions (Fig 7d, e and f).

*Flow cytometry.* In control experiments (Figure 8a), two peaks could be noticed in flow cytometry. One peak, with medium of 158462,48 fluorescent units, was present, corresponding to *R. pubera* diploid nuclei ( $2C = 3,53$  pg). *R. pubera* nuclei totalized 7522 events. Another peak was observed with a medium of 38177,67 fluorescent units. This peak represents *R. breviscula* diploid nuclei, which summed 11431 of the nuclei analyzed. According to this results, diploid genome size of *R. breviscula* would be 0,85 pg. When samples with pseudomonads were tested (Figure 8b), three peaks could be observed. The 2C peak was again observed with 6680 events with 37495,40 medium

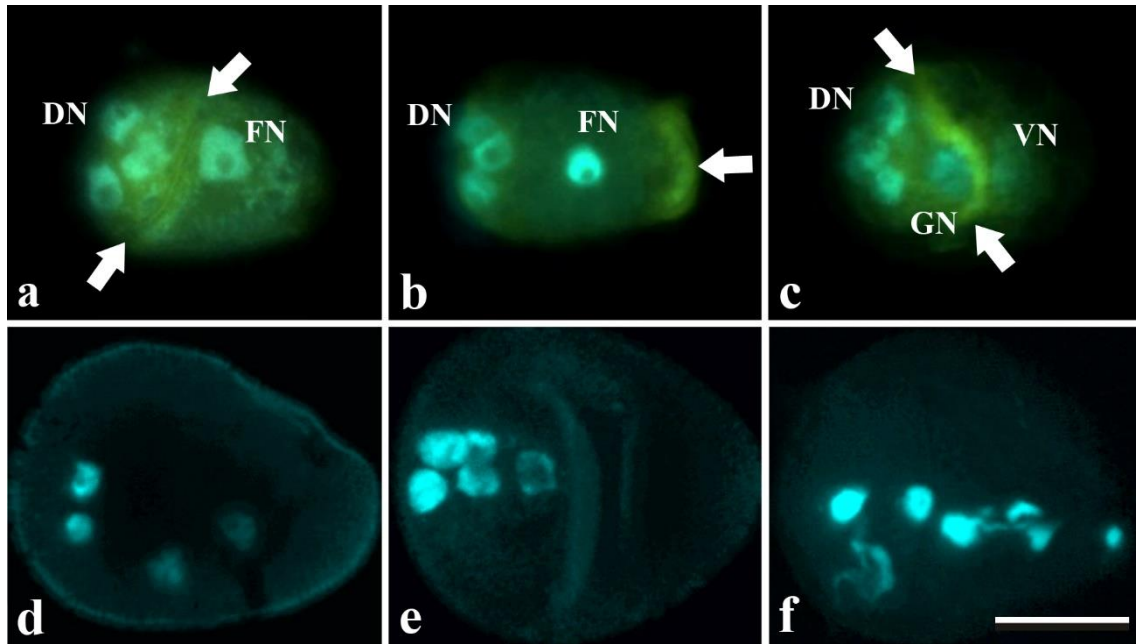
fluorescence. Another well defined peak was observed with 17102 and 20645,78 medium fluorescence. This peak represents the haploid genome, with  $C = 0,46$  pg. A highly heterogenous peak was also observed, with a total of 105353 events, with fluorescent values ranging from 16977,16 to 8062,62 units and genome size ranging from 0,38 pg and 0,18 pg (Figure 9C). Table 1 summarizes all measurements done in flow cytometry.



**Fig. 1** Anther morphology of *R. breviscula* during four stages of development. Semi-thin transversal sections stained by toluidine blue. **(a)** First stage of development showcases all typical tissue layers in regular anthers: epidermis (Ep), endothecium (En), middle layer (Md), tapetum (T) and sporogenic tissue composed by microspore mother cells (MMC). Tapetum and middle layer present no PCD features. **(b)** Note that, during MMC prophase I, the cytoplasm of tapetum and middle layer cells are more stained (arrows). Observe idioblast in the epidermis (\*). **(c)** After meiosis, middle layer can no longer be distinguished, and tapetum cells show advanced PCD features (arrows) Note two degenerative nuclei in the pseudomonad (DN). **(d)** In late stages of development, only epidermis and endothecium can be observed. Debris of the tapetum cells can be seen next to the anther wall (arrows). Degenerative cells (DC) of two neighbor pseudomonads exhibit different stages of PCD. Generative cell (GC) and vegetative nucleus (VN) one pseudomonad are evident in this stage. Scale bar = 10  $\mu$ m.

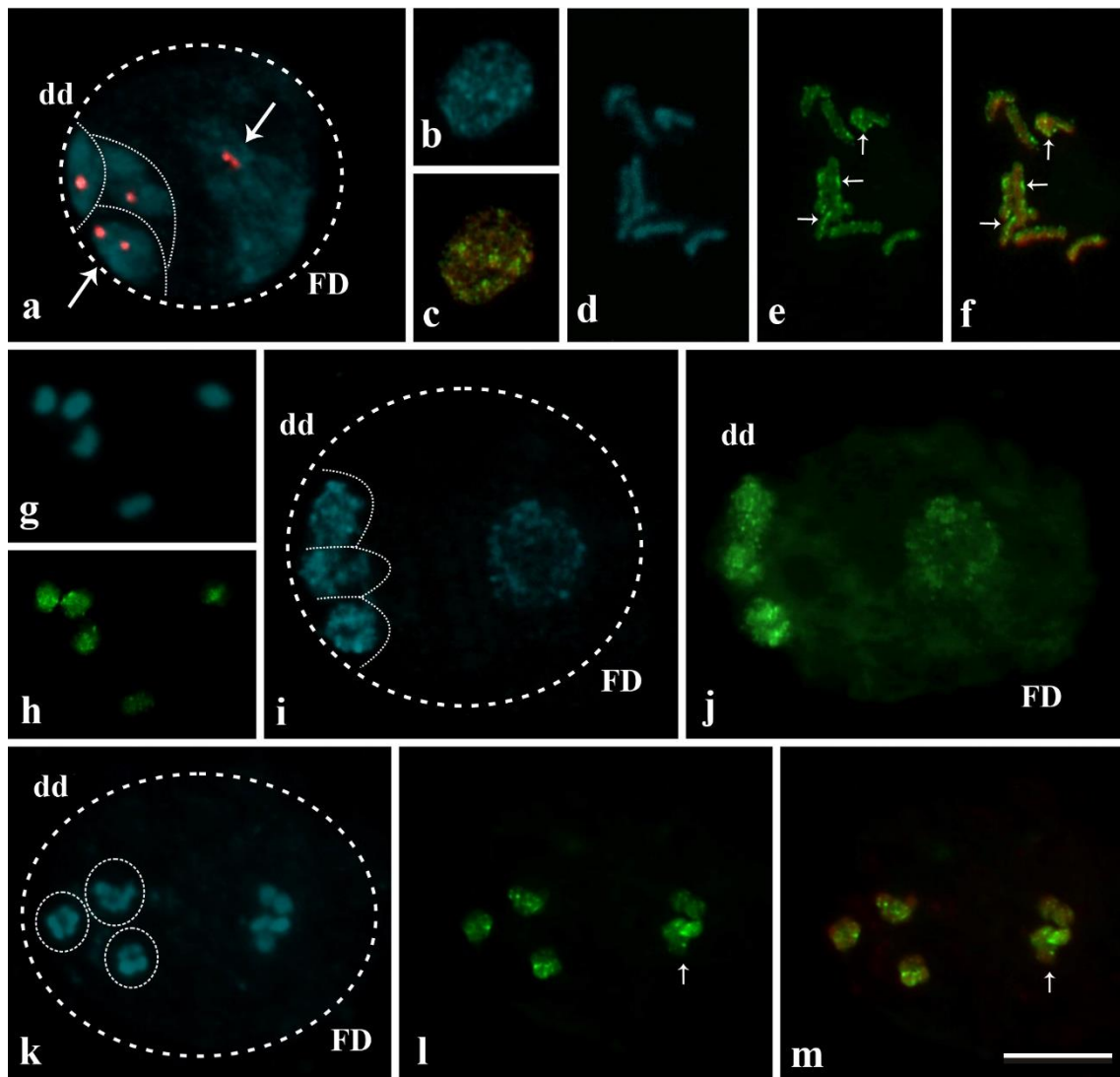


**Fig. 2** Pseudomonad development in *R. breviscula*. **(a-e-i)** Semi-thin transversal sections of anthers stained with toluidine blue **(b-c-f-g-j-k)**. Squashed pseudomonads stained with  $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$ . **(d-h-l)**. Squashed pseudomonads stained with Alexander. Anthers in the right represent which corresponding stages of pseudomonad development in the left can be found. **(a)** Two degenerative nuclei (DN) in the abaxial region and one functional nucleus (FN) in the center can be seen. **(b)** End of telophase II. Note the group of four yellowish nuclei with evident nucleoli located at central-abaxial region of the MMC. Arrow points the one slightly displaced one. **(c)** Early pseudomonads with three degenerative smaller nuclei (DN) in the abaxial region, and the functional larger nucleus (FN) located in the central region. **(d)** Observe that, by the end of telophase II, two similar functional domains are present (arrows). **(e)** End of PM I. Note the presence of the generative cell (GC) in the center of the pseudomonad. The weakly stained vegetative nucleus can be seen in the adaxial region (VN). Degenerative cells are also present (DC). **(f and g)** Pseudomonads before and after PM I. Three smaller degenerative nuclei (DN) with active nucleoli can be seen. Observe functional nucleus (FN) in **(f)** and the generative nucleus (GN) in the center with vegetative nucleus in the adaxial region (VN) in **(g)**. **(h)** During this stage, two cytoplasmic domains can be observed: i) the reduced abaxial one (degenerative domain, dd) and ii) the large adaxial one (functional domain, FD) with several vacuoles (arrows). **(i)** Immature pollen grain containing debris of the degenerative cells (PCD). Generative cell (GC) is located beside the weakly stained vegetative nucleus (VN). In this stage, degenerative nuclei exhibit features of degeneration (PCD) **(j)**, or are absent **(k)**. Generative (GN) and vegetative nucleus (VN) are present. **(l)** Note that, in this stage, only debris of the degenerative domain (dd) can be observed in the abaxial region. Functional domain (FD) in the adaxial region presents condensed aspect and lacks vacuoles. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

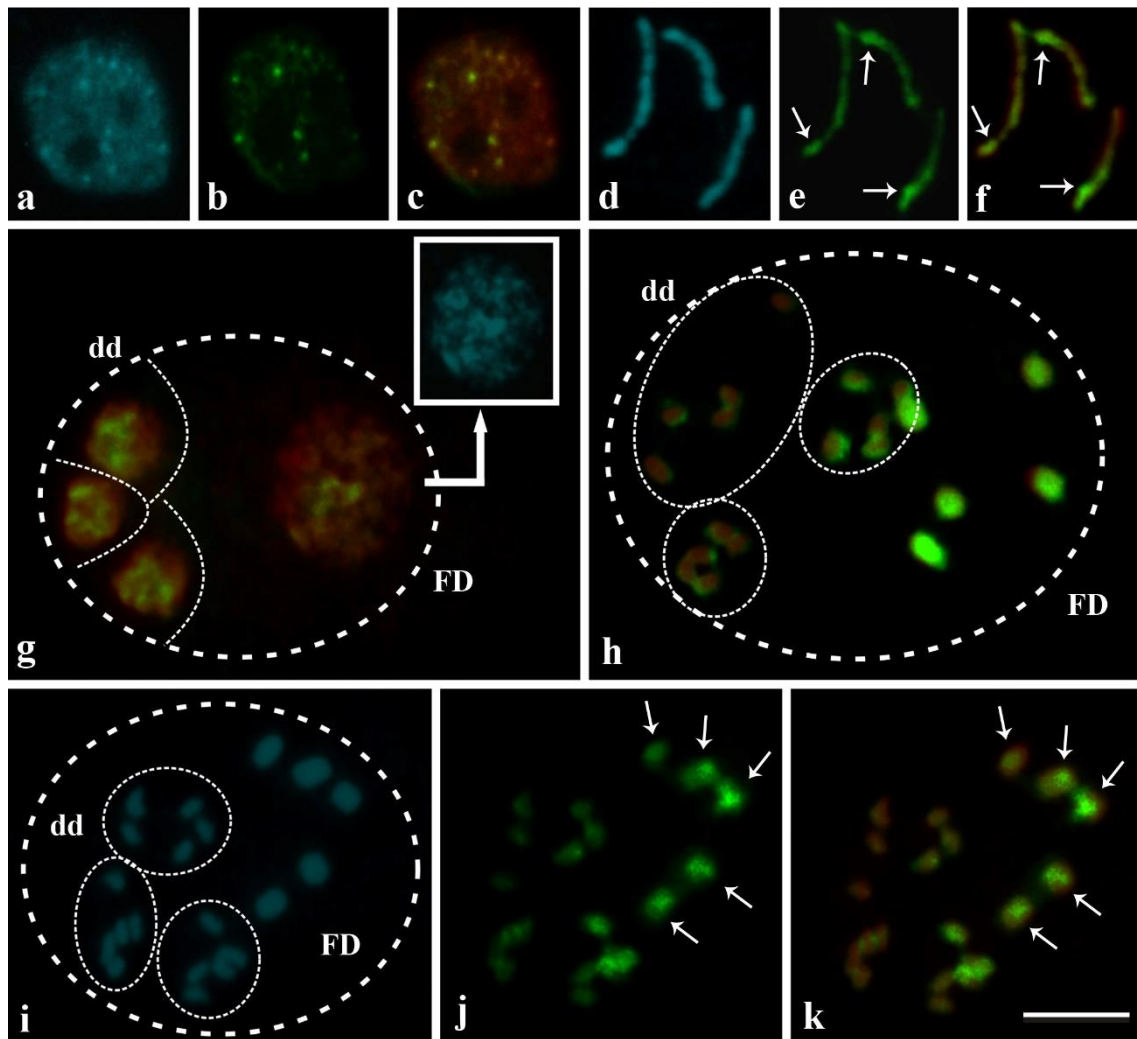


**Fig. 3** Cytoskeleton behavior in pseudomonads of *R. brevivuscula*. **(a-c)** F-Actin detection using FITC-Phalloidin (green) and nuclei counterstained with DAPI (blue). Degenerative nuclei (DN) are positioned in the abaxial region. **(d-f)** Depolymerization of microtubules using colchicine solution. Nuclei stained with DAPI. **(a)** End of telophase II, asymmetrical tetrad. Note bright signals of FITC in the central-abaxial region, with more intense fluorescence signals (arrows) between degenerative and functional nucleus (FN). **(b)** Pseudomonad showing no intense FITC-Phalloidin signals between degenerative nuclei and functional nucleus (FN), but with a slightly more intense sign in the adaxial region (arrow). **(c)** End of PM I. Observe an abundance of FITC bright signals (arrows) between generative (GN) and vegetative nuclei (VN). **(d and e)** Note coenocytic cell with four to five morphologically alike nuclei in the central-abaxial region **(d)**, in the abaxial region **(e)**, and along the cell **(f)**. Observe also that these nuclei highly reassemble the degenerative ones in regular pseudomonads in figures **(a-c)**. **(f)** Coenocytic cell with five nuclei possibly are in degeneration. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

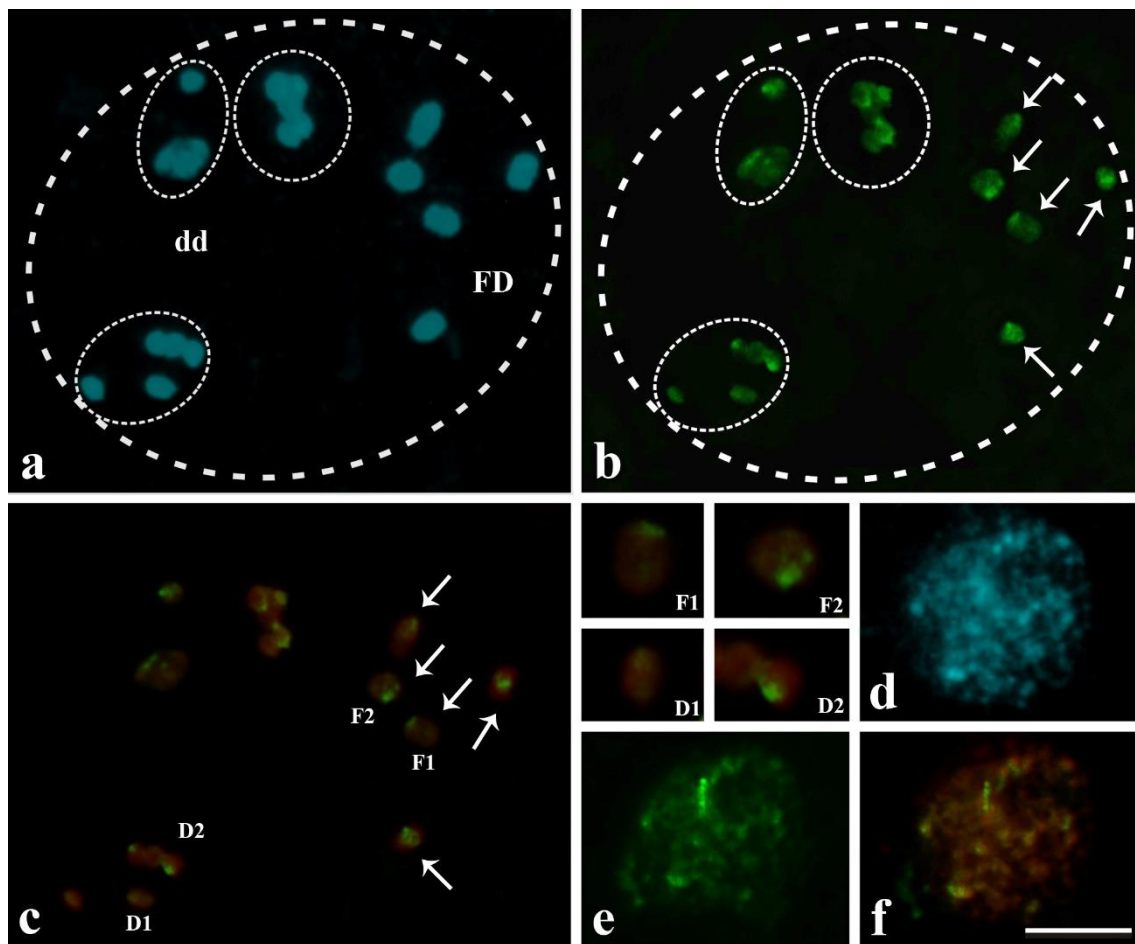




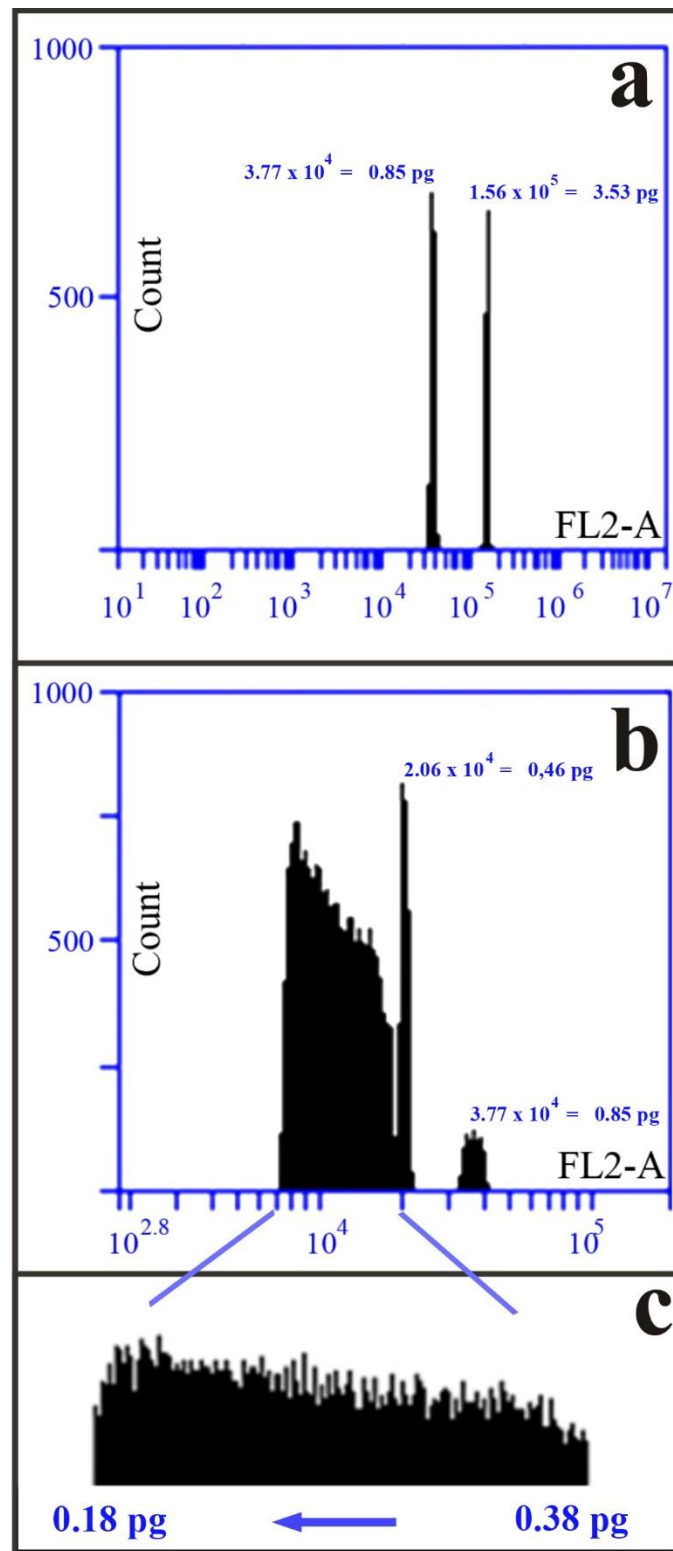
**Fig. 5 Fluorescent *in situ* hybridization in *R. brevivuscula* using 45S rDNA and Tyba-SatDNA.** (a) FISH using 45S rDNA probes labeled with digoxigenin (red). Nuclei stained with DAPI (blue). Arrows point to nuclei with two hybridization signals. (b) Interphase nucleus from somatic tissues stained with DAPI (blue). (c) FISH signals for Tyba-SatDNA probes labeled with biotin (green) spread across its entire nucleus (red). (d) Eight of ten chromosomes of a somatic cell can be seen stained with DAPI (blue). (e) FISH signals for Tyba-SatDNA (arrows). (f) Note that these signals (green) appear to be located along the entire holokinetic chromosome (red). (g) Five meiotic chromosomes can be observed stained with DAPI (blue). (h) FISH signals for Tyba-SatDNA probes can be observed (green). Their pattern, however, seems different than that observed for somatic chromosomes, due to their disparate aspect. (i) Pseudomonads of *R. brevivuscula* stained with DAPI (blue). Three degenerative nuclei with condensed aspect can be seen in the degenerative domain (dd), while a large decondensed nucleus is present in the functional domain (FD). (j) When Tyba-SatDNA probes are used for FISH for in pseudomonads (green), degenerative nuclei appear to present more intense hybridization signals in the degenerative domain when compared to the functional nucleus, probably due to the differential chromatin condensation. (k) Pseudomonads in PM I stained with DAPI (blue) and (l) FISH using Tyba-SatDNA probes in this same stage showing the same hybridization profile observed for meiotic chromosomes. Also observe that during this stage chromosomes in the degenerative domain (dd) are smaller than those in the functional domain (FD). (m) Notice that there is no noticeable difference in the hybridization signal intensity, in green, between chromosomes from the degenerative domain (dd) and functional domain (FD) in red. Scale bar = 10  $\mu$ m



**Fig. 6** Fluorescent *in situ* hybridization in *R. brevivuscula* using *Rb*-Copia probes. **(a)** Interphase nucleus from somatic tissue stained with DAPI (blue) and **(b)** FISH signals (green) shows that *Rb*-Copia probes labeled with biotin accumulate in specific regions of the nucleus. **(c)** Note that FISH signals (green) are located in chromocenter regions in the nucleus (red). **(d)** Three chromosomes of a somatic cell can be seen stained with DAPI and their respective FISH signals. **(e)** Note that *Rb*-Copia probes (green) are predominantly located at the heterochromatic ends of the chromosome **(f)**, which are most likely correspondent to the chromocenter regions detected in interphase nucleus. **(g)** FISH in pseudomonads present a similar scenario from that observed for Tyba-SatDNA probes: three degenerative nuclei (red) presenting condensed aspect and intense hybridization signals (green) in the degenerative domain (dd), while a large, decondensed functional nucleus (red) with less intense signals can be observed in the functional domain (FD). Inset shows again that FISH signals for *Rb*-Copia probes are located in chromocenter regions of the interphase nucleus, stained with DAPI (blue). This setting, however, is changed during PM I. In **(h)**, an overexposed capture shows that chromosomes in the degenerative domain (dd) in red present much less FISH signals (green) when compared to the chromosomes in the functional domain, also in red (FD). Note again that chromosomes in the degenerative domain (dd) are smaller than those in the functional domain. Figure **(i)** shows again a pseudomonad during PM I stained with DAPI (blue) and **(j)** shows FISH signals in normal exposure (green). Arrows point to the functional cells chromosome. Figure **(k)** represents the merged picture showing again that chromosomes (red) from the functional domain (arrows) present much more intense hybridization signals (green) in relation to those located in the degenerative domain. Scale bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 7** Fluorescent *in situ* hybridization in *R. brevisuscula* using *Rb*-Gypsy probes. **(a)** Pseudomonads in PM I stained with DAPI (blue) and **(b)** FISH signals for *Rb*-Gypsy probes labeled with biotin in this same stage (green), with arrows pointing to the chromosomes from the functional cell. Notice again that chromosomes in the functional domain (FD) have significantly greater size than those found in the degenerative domain (dd). **(c)** Observe in the merged picture that there is no difference in the intensity of hybridization signals (green) in chromosomes from the functional and degenerative domains (red). **(F1)** and **(F2)** show insets of two chromosomes from the functional domain with FISH signals in their ends. **(D1)** and **(D2)** show their correspondents in the degenerative domain, with smaller size but prominent FISH signals in their ends. **(d)** Interphase nucleus from a somatic cell stained with DAPI (blue). **(e)** FISH signals (green) indicate that, like *Rb*-Copia, this probe accumulates in specific regions of the nucleus. However, **(f)** shows that, unlike *Rb*-Copia, these signals (green) are located adjacent to chromocenter regions of the nucleus (red). Scale bar = 10  $\mu$ m.



**Fig. 8** Flow cytometry. **(A)** Flow cytometry of *R. breviscula* and *R. pubera* leaf tissue. Two peaks can be observed: one with  $1,56 \times 10^5$  fluorescent units represents 2C nuclei of *R. pubera*, which has a known value of 3,53 pg. Second peak, with  $3,77 \times 10^4$  fluorescent units, represents *R. breviscula* 2C nuclei. Based on the fluorescence value of *R. pubera* nuclei, it can be concluded that the genomic value of *R. breviscula* is  $2C = 0,85$  pg. **(B)** Flow cytometry of *R. breviscula* pseudomonads. Note that the 2C peak can be observed again and next to it, another peak is seen with  $2,06 \times 10^4$  fluorescent units, representing haploid nuclei with  $C = 0,46$  pg. A large heterogeneous peak is also observed, representing a diverse population of nuclei with C values smaller than 0,46 pg. **(C)** The large heterogeneous peak represents nuclei population ranging from 0,38 pg to 0,18 pg.

CONTROL	cont	fluo	CV	Pg
RP	7522	158462,48	0,05	0,85
RB	11431	38177,67	0,06	3,53
PSEUDOMONADS	cont	fluo	CV	pg
2C	6680	37495,40	0,05	0,84
C	17102	20645,78	0,03	0,46
D (total)	105353	11377,67	0,26	0,25
D0	10452	16977,16	0,04	0,38
D1	11672	15065,38	0,03	0,34
D2	19384	13060,18	0,05	0,29
D3	20139	10957,86	0,05	0,24
D4	19090	9397,71	0,04	0,21
D5	25877	8062,62	0,05	0,18

**Table 1.** Total measurements done in flow cytometry. RP = *Rhynchospora pubera* diploid nuclei from leaf tissue. RB = *Rhynchospora breviuscula* diploid nuclei from leaf tissue. 2C = Diploid nuclei from *R. breviuscula* pseudomonads. C = Haploid nuclei from *R. breviuscula* pseudomonads. D (total) = measurement of the entire population of degenerative nuclei. D0 – D5 = measurements taken from five different stages of degeneration.

### 3.5. Discussion

*R. breviuscula* early anther morphology is similar to that found in higher plants, with the five typical tissues described for monocots, including secretory tapetum (Bedinger 1992, Mariath et al. 2006). However, the sporogenous tissue presents a different organizational profile, with the development of an asymmetrical tetrad (pseudomonad), such as reported in other Cyperaceae (Maheshwari 1950, Strandhede 1965, Shivanna and Johri 1985, Kirpes et al. 1996, Furness and Rudall 1999, Coan et al. 2010, Brown and Lemmon et al. 2000, Ranganath and Nagashree 2000, San Martin et al. 2013). In *R. breviuscula*, three degenerative nuclei occupy the abaxial region and a functional nucleus appears located the center of the pseudomonad. This kind of arrangement is similar to the one reported by San Martin et al. (2013) in *Rhynchospora pubera*, but different to that reported for other genera of Cyperaceae, such as *Eleocharis* and *Carex*. In these two cases, the degenerative nuclei occupy the adaxial region of the pseudomonad (Padhye 1968, Kirpes et al. 1996, Furness and Rudall 1999, Brown and Lemmon 2000).

The development of an asymmetric tetrad initiates with a greater distancing of one nuclei pair in relation to the other during telophase II by cytoskeleton elements, such as demonstrated by Brown and Lemmon (2000) in *Carex blanda*. This distancing, mediated by phragmoplast, may be determinant for formation of degenerative and functional domains in pseudomonads. Tests done with FITC-Phalloidin in *R. breviuscula* showed that F-Actin appears mostly next to the degenerative cells plate, highlighting its separation from the functional domain. The same was reported in *R. pubera* using other immunocytochemical procedures (San Martin et al. 2013). F-actin was also associated in the PM I of *R. breviuscula*, during vegetative and generative cell separation, reinforcing the role of phragmoplast organization in pseudomonad development.

There is no doubt that phragmoplast is essential to the physical organization of functional and degenerative domains in pseudomonads of Cyperaceae. The degenerative domains of *R. breviuscula*, which appeared viable and active when tested by silver nitrate staining and Alexander staining, are kept functional until late stages of pollen development, as reported in *R. pubera* (San Martin et al. 2013). But our doubt was: What are the consequences of phragmoplast disruption to the functionality of both domains? When early anthers of *R. breviuscula* were treated with colchicine, some “pseudomonads” exhibited four equal nuclei, morphologically similar to the degenerative nuclei of control tests. These results indicate that the cytoplasmic environments delimitation must be decisive for regular gametogenesis of one meiotic product in the Cyperaceae context. The same colchicine treatment also resulted in the presence of five nuclei in the pseudomonads, which could be explained by karyokinesis of one nucleus after meiosis. This could refer to the functional nucleus, since it is uncommon for degenerative nuclei to undergo karyokinesis and the functional nuclei always gives rise to daughter nuclei, as commented by Ranganath and Nagashree (2000). This is in accordance with our findings since degenerative nuclei never generated daughter nuclei in control pseudomonads of *R. breviuscula*. Thus, these results indicate that selection of the functional meiotic product in a regular condition (without colchicine) would not be stochastic, since even in a homogenous environment (with colchicine), only one nucleus would be fully able to complete karyokinesis. Studies of Tanaka and Ito (1981) in *Tulipa gesneriana* and Ueda et al. (2012) in *Nicotiana tabacum* (both without pseudomonads) showed that the microspores with disrupted microtubules presented a symmetric PM I generating two nuclei with vegetative features, and not generative. On the contrary of these two examples, which both nuclei are functional, in *R. breviuscula* this disturbance

in PM I produced nuclei similar to degenerative cells and not functional (neither vegetative nor generative).

A peculiar characteristic of degenerative cells were chromosome with smaller sizes than those of functional cells. Chromosome shortening in the degenerative cells is well reported in Cyperaceae, such as in other species of *Rhynchospora* and other genera like *Eleocharis* (Harms 1972, Luceño et al. 1998). Tests using FISH with repetitive DNA probes suggest that this difference in size could be due to the loss of repetitive motifs. The presence of one or two 45S rDNA signals per haploid nuclei, with similar sizes corroborates with the literature for *R. breviscula* (Vanzela et al. 1997), and supports the observation of two nucleoli per nucleus in light microscopy analysis. Besides, it could explain the functionality of nucleolar organizer regions until late stages of degeneration observed with silver staining. The FISH using Tyba-SatDNA probe showed differences of signal intensity between degenerative and functional nuclei, with the latter presenting less intense signals. However, this difference seems to be related to condensation state of the chromatin rather than with number of Tyba motifs. Although there was no relative signal intensity difference between the replicated chromosomes in the degenerative and functional cells during PM I when using both Tyba-SatDNA and *Rb*-Gypsy probes, chromosome shortening in the degenerative ones indicate loss in repetitive motifs of these repetitive DNA, as well as loss in the total chromatin content. Flow cytometry results corroborates to this statement. The large heterogeneous peak observed ranging from 0,35 pg to 0,18 pg confirms that a large population of nuclei analyzed had smaller genomic content than expected for 2C or C nuclei of *R. breviscula* (with 0,85 pg and 0,46 pg, respectively). The setting for FISH changes when *Rb*-Copia probe was used, which contains a fragment of a reverse transcriptase of the *Ty1-copia* superfamily. In FISH, this probe showed more intense signals in the degenerative nuclei in relation to the functional

one, probably due to the differential chromatin condensation. However, in PM I, the replicated chromosomes in the functional domain presented far more intense signals than those located in the degenerative cells. This result indicates a massive reduction in repeat numbers related to *Ty1-copia*-like retrotransposons, even when compared to the satellite DNA motifs. This difference between *Ty1-copia*-like and Tyba-SatDNA can be explained by the fact that Tyba belongs to a repetitive DNA group related to centromere organization of the *Rhynchospora* holokinetic chromosome (Marques et al. 2015, submitted), while *Ty1-copia*-like is a retrotransposon of disperse localization. However, *Ty3-gypsy*-like elements do not appear to have the same reduction of repeat numbers, even though they are also of disperse location. FISH for interphase somatic nuclei showed that *Ty1-copia*-like repeats accumulate in chromocenter regions, while *Ty3-gypsy*-like repeats are located adjacent to it. Thus, it can be assumed that DNA from chromocenter regions are preferably lost during degenerative cells development.

Our results are not yet conclusive about the mechanism which leads to the decrease of chromatin during the degeneration process in PCD, neither the metabolic pathways involved in it. There is a report in the literature of *Tc1/marine* retrotransposon fragments being lost in the macronucleus in *Paramecium* genera (Dubois et al. 2012). These fragments, called internal eliminated sequences (IES) are located interrupting coding regions and would be precisely excised with posterior recovery of genetic activity. If we evaluate comparatively this case to our finding in *R. brevisuscula*, the decrease of *Ty1-copia*-like motifs would be perfectly possible, especially in a model involving a nucleus arising from an asymmetric division, as reported for *Paramecium*. Our results indicate that the DNA families early eliminated from *R. brevisuscula* genome are not essential in maintaining cellular viability until late stages of PCD. In conclusion, the generation process of only one pollen grain starting from one MMC is multifactorial. This

process involves not only the organization of an asymmetric tetrad, but also possible nuclear selection and the non-random elimination of repetitive DNA families in the degenerative cells. In this last case, these motifs seem to belong to repetitive DNA families whose redundancy would not affect cellular stability during PCD a priori.

**Acknowledgements.** The authors thank the Brazilian agencies Fundação Araucária, CNPq and CAPES for financial support. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho caracteriza a microsporogênese e microgametogênese em *Rhynchospora breviuscula* H. PFEIFF e contribui para entendimento sobre os eventos de morte celular programada durante o desenvolvimento da pseudomônade em Cyperaceae. De maneira geral, destacam-se as seguintes conclusões:

i) Após a meiose os núcleos degenerativos são deslocados para a porção abaxial da pseudomônade. Apesar de sucessivamente menores, esses núcleos permanecem funcionais até depois da PM I. O citoplasma dessas células também aparece sucessivamente menor e funcional.

ii) O deslocamento do fragmoplasto teria como função garantir que um dos produtos meióticos siga a gametogênese padrão. A presença de células tratadas com colchicina com cinco núcleos também revela que, mesmo em situações anormais, apenas um núcleo tem capacidade de cariocinese, indicando que sua seleção não seria estocástica. Os dados levantados ainda revelam que existiriam outras vias de diferenciação de núcleos generativos e vegetativos.

iii) Os cromossomos de células degenerativas apresentam menor tamanho, o que indica perda global de cromatina. Enquanto que a sonda de DNA satélite não revelou diferentes intensidades de sinal, a sonda para elementos *copia*-like mostrou que cromossomos de células degenerativas apresentam uma quantidade muito menor de sinais do que os da célula funcional. Isso indica que os núcleos degenerativos diminuem de tamanho possivelmente também devido à perda de material genético.

A partir dos pontos levantados nesse trabalho, torna-se evidente a necessidade de novos estudos que esclareçam os questionamentos deixados em aberto:

i) O experimento realizado com colchicina atua em apenas um dos elementos organizadores do fragmoplasto. Como os outros elementos poderiam interferir na

formação de núcleos degenerativos e funcional em Cyperaceae? Como seriam afetados os demais aspectos dessas células, como citoesqueleto e organelas?

ii) Células tratadas com colchicina apresentaram cinco núcleos ao invés dos quatro esperados após a meiose, indicando que apenas um dos núcleos teria capacidade de cariocinese. Qual seria o fator responsável por essa capacitação?

iii) No caso de *R. breviscula*, os núcleos formados após a PM I assemelham-se ao degenerativo, ao contrário dos casos mostrados na literatura, em que a perturbação da PM I gera núcleos funcionais parecidos com o núcleo vegetativo. Qual seria o motivo dessa diferença?

iv) A hibridização *in situ* revelou a perda de elementos *copia*-like do genoma de células degenerativas. Qual seria o mecanismo pela qual são perdidos e qual seria a sua significância biológica para o desenvolvimento dessas células? Elementos de DNA satélite não são perdidos na mesma frequência que elementos *copia*-like, qual seria a razão para essa diferença?

v) Mesmo com a perda desses elementos, os núcleos degenerativos mantêm sua função por um longo período do desenvolvimento até serem abortados, poderiam esses elementos ser de fato redundantes ou a sua perda afetaria a estabilidade do genoma, contribuindo para sua posterior degeneração?

**REFERENCIAS**

- Alexander MP (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Tech* 62: 107–12.
- Bedinger P (1992) The Remarkable Biology of Pollen. *Plant Cell* 4:879-887.
- Brown RC, Lemmon BE (2000) The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae). *Amer J Bot* 87(1):1–11.
- Coan IA, Alves MV, Scatena VL (2010) Evidence of pseudomonad pollen formation in *Hypolytrum* (Mapanioideae, Cyperaceae). *Aust J Bot* 58: 663-672.
- Dubois E, Bischerour J, Marmignon A, Mathy N, Régnier V, Bétermier M (2012) Transposon Invasion of the *Paramecium* Germline Genome Countered by a Domesticated PiggyBac Transposase NHEJ Pathway. *Int J Evol Biol*. doi: 10.1155/2012/436196.
- Eady C, Lindsey K, Twell D (1995) The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *Plant Cell* 7:65-74.
- Furness CA, Rudall PJ (1999) Microsporogenesis in Monocotyledons. *Ann Bot* 84: 475-499.
- Furness CA, Rudall PJ (2011) Selective microspore abortion correlated with aneuploidy: an indication of meiotic drive. *Sex Plant Reprod* 24:1-8.
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979). Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl Acids Res* 7(7): 1869-1885.

- Hakansson A (1954) Meiosis and pollen mitosis in x-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. *Hereditas* 40(3-4): 325-345.
- Harms LJ (1972) Citotaxonomy of the *Eleocharis tenuis* complex. *Amer J Bot* 59: 483-487.
- Heslop-Harrison J, Mackenzie A (1967) Autoradiography of soluble [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ] thymidine derivatives during meiosis and microsporogenesis in *Lilium* anthers. *J Cell Sci* 2: 387-400
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *J Cell Biol* 27:137A
- Kirpes CC, Clark LG, Lersten NR (1996) Systematic significance of pollen arrangement in microsporangia of Poaceae and Cyperaceae: review and observations on representative taxa. *Am J Bot* 83(12): 1609-1622.
- Luceño M, Vanzela ALL, Guerra M (1998) Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can J Bot* 76: 440-449.
- Maheshwari P (1950) *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Mariath JAE, Santos RP, Bittencourt JR (2006) Flor. In: Beatriz Appezzato-da-Glória, Sandra Maria Carmello-Guerreiro (org). *Anatomia Vegetal* 2<sup>a</sup> ed. Viçosa: Universidade Estadual de Viçosa.
- Mariath JEA, Vanzela ALL, Kaltchuk-Santos E, De Toni KLG, Andrade CGTJ, Silvério A, Duarte-Silva E, Da Silva CRM, San Martin JAB, Nogueira F, Mendes SP

(2012) Embryology of Flowering Plants Applied to Cytogenetic Studies on Meiosis. In: Andrew Swan. (Ed.). Meiosis – Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity. InTech, DOI: 10.5772/31885

Marques A, Ribeiro T, Macas J, Neumann P, Novák P, Pellino M, Shubert V, Fuchs J, Ma W, Kuhlmann M, Brandt R, Vanzela ALL, Simkova H, Pedrosa-Harand A, Houben A (2015) The holocentromeres of *Rhynchospora pubera* are composed of dynamics repeat-rich centromere units. PNAS, submitted.

Mascarenhas SP (1989) The Male Gametophyte of Flowering Plants. Plant Cell 1: 657-664.

O'Brien TP, McCully ME (1981) The study of plant structure: principles and selected methods. Melbourne, Australia: Termarcarphi Pty. Ltd.

Padhye MD (1968) Male and female gametophytes of *Eleocharis geniculata* Roem et Schult. Proc Indian Acad Sci B 67(2):54-60.

Ranganath RM, Nagashree NR (2000) Selective cell elimination during microsporogenesis in sedges. Sex Plant Reprod 13:53-60.

San Martin JAB, Andrade CGTJ, Mastroberti AA, Mariath JEA, Vanzela ALL (2013) Asymmetric cytokinesis guide to the development of pseudomonads in *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). Cell Bio Int 37:203-2012.

Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004) Stamen Structure and Function. Plant Cell 16:S46-S60.

Shivanna KR, Johri BM (1985) The angiosperm pollen – structure and function. Wiley Eastern, New Delhi.

- Simpson DA, Furness CA, Hodkinson TR, Muasya AM, Chase MW (2003) Phylogenetic relationships in Cyperaceae subfamily Mapanioideae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. *Am J Bot* 09(7):1071-1086.
- Strandhede S (1965) Chromosome studies in *Eleocharis, subser. palustris*. II. Pollen mitosis with special reference to some strains with 15 chromosomes, and formation of secondarily unreduced pollen grains. *Hereditas* 53: 374-388.
- Strandhede S (1973) Pollen development in the *Eleocharis palustris* group (Cyperaceae). II. Cytokinesis and microspore degeneration. *Bot Not* 126:255–265.
- Tanaka I (1997) Differentiation of generative and vegetative cells in angiosperm pollen. *Sex Plant Reprod* 10:1-7.
- Tanaka I, Ito M (1981) Control of Division Patterns in Explanted Microspores of *Tulipa gesneriana*. *Protoplasma* 108: 329-340.
- Ueda K, Ono M, Iwashita J, Wabiko H, Inoue M (2012) Generative cell-specific activation of the histone gH2A gene promoter of *Lilium longiflorum* in tobacco. *Sex Plant Reprod* 25:247-255.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Jouve N, Luceño M, Guerra M (1998) Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chromosome Res* 6:345-349.
- Zaki MAM, Dickinson HG (1991) Microspore-derived embryos in *Brassica*: The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex Plant Reprod* 4:48-55.