



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THAÍSSA BOLDIERI DE SOUZA

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE
RETROTRANSPOSONS NOS GENOMAS E CROMOSSOMOS
DE *Eleocharis* (CYPERACEAE)**

Londrina
2017

THAÍSSA BOLDIERI DE SOUZA

**DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE
RETROTRANSPOSONS NOS GENOMAS E CROMOSSOMOS
DE *Eleocharis* (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. Dr. André Luís Laforga Vanzela

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Souza, Thaíssa Boldieri.

Diversidade e distribuição de retrotransposons nos genomas e cromossomos de *Eleocharis* (Cyperaceae) 64 f. : il.

Orientador: André Luís 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, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Citometria de fluxo - Tese. 2. Elementos de transposição - Tese. 3. Híbridização *in situ* - Tese. 4. Holocêntricos - Tese. I. Vanzela, André Luís Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

THAÍSSA BOLDIERI DE SOUZA

**FENOTIPAGEM BIOQUÍMICA E ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO
GENÔMICA AMPLA EM UMA COLEÇÃO DE *Coffea arabica***

Tese 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 Doutor.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG

Profª. Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Odair Firmino de Souza, minha mãe Edna Boldieri de Souza e minhas irmãs Angelita e Mariene, por todo apoio durante minha vida e minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer durante a minha caminhada

A minha família, meu pai Odair que sempre incentivou que suas filhas estudassem e que seguissem suas vontades e sonhos. Minha mãe Edna, que esteve firme em todos os momentos, me apoiando durante toda minha formação até aqui, sempre me ouvindo e aconselhando. Às minhas irmãs Angelita e Mariene, que jamais deixaram de me acolher e me ajudar quando necessário. Aos meus cunhados Paulo e James por também estarem presentes ao meu lado nessa caminhada.

Agradeço ao Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela pelo acolhimento em seu laboratório há vários anos e por todo conhecimento compartilhado durante minha formação. Principalmente pela confiança depositada em meu trabalho e por ter acreditado em meu potencial quando nem eu mesma acreditava. Pelas conversas e conselhos aplicados a carreira acadêmica, mas também pelos que serão levados para vida toda. Como orientador e pessoa notável, terá sempre meu respeito e gratidão.

As companheiras de laboratório, mais do que isso, amigas que levarei comigo para a vida. Renata, Paula e Viviane que por muitas vezes abriram mão de seus próprios afazeres para me ajudar. Sou grata pela amizade, sobretudo pelo companheirismo, dentro e fora do laboratório. Ao Lucas, pelo apoio e disponibilidade sempre que precisei. A Joana, Jaqueline, Ana Beatriz e Camila, por estarem sempre disponíveis para me ouvir, sobretudo, reclamar, amigas que jamais serão esquecidas. Agradeço muito a vocês pela amizade, pelas risadas, conselhos, e que o olhar pelo próximo seja sempre recíproco.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Genética e Biologia Molecular, a CAPES, CNPq, FINEP e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

SOUZA, Thaíssa Boldieri. **Diversidade e distribuição de retrotransposons nos genomas e cromossomos de *Eleocharis* (Cyperaceae)**. 2017. 64 f. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

As sequências repetitivas são os principais componentes dos genomas das plantas. Elementos transponíveis (ETs), que constituem a parte móvel dos genomas, são divididos em duas classes principais (Classe I e Classe II) de acordo com seu modo de transposição. Elementos de Classe I, ou retrotransposons, são sintetizados e transpostos usando um RNA intermediário. Devido ao seu modo de replicação, os retrotransposons aparecem mais acumulados nos genomas e as suas linhagens podem acumular-se diferencialmente dependendo do grupo vegetal. As espécies de *Eleocharis* possuem cromossomos holocêntricos, que tornam os cariótipos mais tolerantes aos eventos de disploidia, e que podem estar associados ao estresse genômico e à expressão dos elementos transponíveis. Nosso objetivo foi comparar a ocorrência e a distribuição cromossômica de diferentes linhagens *Copia* e *Gypsy* em cariótipos de espécies de *Eleocharis*, e associá-las com os valores de conteúdo de DNA. Foram selecionadas amostras com condições genômicas diferentes, considerando os níveis de ploidia, o valor do conteúdo de DNA e a presença de rearranjos cromossômicos. Para isso, foram utilizadas técnicas de quantificação de DNA por citometria de fluxo, análises genômicas e de citogenética molecular. Os genomas de *E. elegans* e *E. geniculata* foram parcialmente sequenciados por Illumina, os quais serviram como fonte para buscar proteínas conservadas de retrotransposons com LTR (LTR-RTs). Domínios de transcriptase reversa foram utilizados para reconhecer e comparar linhagens desses elementos e, juntamente com os domínios proteicos da integrase e RnaseH, foram utilizados para a construção de gráficos de aproximação genética e desenho de primers para a produção de sondas. Os dados do sequenciamento mostraram que as LTR-RTs foram a fração repetitiva mais abundante, com predominância dos membros dos clados *Athila/Tat* e *Sirevirus*. Os dados de citogenética mostraram uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de ploidia e a quantidade de DNA nuclear, atribuída principalmente à poliploidia, e não pelo efeito dos retrotransposons. O resultado da FISH mostrou uma distribuição predominantemente dispersa dos retrotransposons nos cromossomos, mas com diferenças claras na quantidade e localização física das linhagens de *Copia* e *Gypsy* entre espécies. Apesar desse estudo ter sido baseado em um sequenciamento de baixa cobertura, nossa estratégia foi útil para estudar a diversidade de LTR-RTs. Nossos resultados mostraram que, embora os retrotransposons apareçam diferentemente acumulados nesses genomas, não há uma distribuição atípica de LTR-RTs devido à condição holocinética, exceto para membros da linhagem CRM que apareceram distribuídos ao longo de cromátides holocentroméricas. Do mesmo modo, as diferenças no conteúdo de DNA podem ser atribuídas em menor intensidade à atividade e/ou ocorrência de retrotransposons, e de modo mais efetivo pela poliploidia.

Palavras-chave: Chave: citometria de fluxo. Elementos de transposição. Hibridização in situ. Holocêntricos.

SOUZA, Thaíssa Boldieri. **Diversity and distribution of retrotransposons in genomes and chromosomes of *Eleocharis* (Cyperaceae)**. 2017. 64 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Repetitive sequences are main plant genomes components. Transposable elements (TEs) constitute the mobile part of the genomes, and are divided into two principal classes (Class I and Class II) according to their transposition modes. Class I elements, or retrotransposons, are synthesized and transposed using an intermediate RNA. Due their replication mode, the retrotransposons can appear more amplified in the genomes and their lineages can accumulate differentially depending on the plant group. *Eleocharis* species have holocentric chromosomes, which make the karyotypes more tolerant to dysploidy events, and they may be associated with genomic stress and transposable elements expression. Our objective was to compare the occurrence and chromosomal distribution of different *Copia* and *Gypsy* lineages in *Eleocharis* species. It was choose samples with different genome conditions, considering ploidy levels, DNA C-value and chromosomal rearrangements. For this, DNA quantification techniques were used by flow cytometry, genomic and molecular cytogenetic analyzes. The genomes of *Eleocharis elegans* and *E. geniculata* were partially sequenced using Illumina sequencing which served as source for searching for conserved proteins of retrotransposons with LTR (LTS-RTs). Reverse transcriptase domains were used for recognizing and comparing lineages and, along with integrase and RNaseH protein domains, they were used to construction of genetic approximation graphs and primers design for probes production of different *Copia* and *Gypsy* lineages. Sequencing data has shown that LTR-RTs were the most abundant repetitive fraction, with predominance of Athila/Tat and Sirevirus clade members. Cytogenomic data has shown a positive correlation between ploidy levels increase and nuclear DNA amount, attributed mainly by polyploidy and not due to retrotransposons effects. FISH exhibited predominantly dispersed distribution of retrotransposon probes in the chromosomes, but with evident differences in the quantity and physical location of the *Copia* and *Gypsy* lineages between species. This strategy was useful to study LTR-RTs diversity using low coverage sequencing. Our results showed that, although retrotransposons appear differently accumulated in these genomes, there is not an atypical distribution of LTR-RTs due to holokinetic condition, except to CRM lineage members that appeared distributed along holocentromeric chromatids. Similarly, differences in DNA content in this comparison can be attributed modestly by the retrotransposons activity and/or occurrence, and most effectively polyploidy.

Keywords: In situ hybridization. Flow cytometry. Holocentric chromosomes. Transposition elements.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Citometria de fluxo e comparação de conteúdo de DNA. (A) Histograma mostrando o resultado de saída de uma leitura de citometria de fluxo em *E. maculosa* com o padrão *S. lycopersicum* ($2C = 9,73 \times 10^4$ de fluorescência). O pico da esquerda com 0,87 pg ($4,37 \times 10^4$ de fluorescência) representa o valor $2C$ em *E. maculosa* ($2n = 6$), enquanto que o pico da direita com 1,96 pg representa o valor $2C$ do padrão. (B) Histograma mostrando o valor de 1,90 pg ($9,0 \times 10^4$ de fluorescência) em *Eleocharis geniculata*, com o padrão *R. breviscula* com $2C = 0,80$ pg e fluorescência de $3,78 \times 10^4$. Picogramas = pg, $CV < 5\%$. (C) Comparação dos valores obtidos por citometria de fluxo para nove espécies de *Eleocharis*, com os valores de DNA total em células somáticas ($2C$), quantidade de DNA do complemento haploide (C) e quantidade de DNA do provável complemento monoploide (Cx), em picogramas. Note que o aumento no conteúdo de DNA acompanhou o aumento no nível de ploidia, exceto em *E. flavescens*, cujos valores ficaram abaixo do esperado..... 36
- Figura 2.** Correlação entre número cromossômico e a quantidade de DNA. (A) Comparação dos valores $2C$ (DNA total) e Cx (provável complemento monoploide), obtidos por citometria de fluxo para nove amostras de sete espécies de *Eleocharis*. Note que o aumento no conteúdo de DNA acompanhou o aumento no nível de ploidia, exceto em *E. flavescens*, cujos valores ficaram abaixo do esperado. (B) Correlação entre no número cromossômico e a quantidade de DNA, segundo complemento monoploide (Cx), onde $R^2 = 0,712$ 37

- Figura 3.** Cromossomos corados convencionalmente com Giemsa, mostrando variação no número cromossômico e a ausência de constrições primárias. **(A)** Prometáfase em *E. maculosa* com $2n = 6$. **(B-D)** Metáfases mitóticas em *E. maculosa* com $2n = 6$, *E. maculosa* com $2n = 10$, *E. geniculata* com $2n = 10$, respectivamente. **(E)** Metáfase meiótica em *E. geniculata* com $2n = 20$. Observe a formação apenas de bivalentes. **(F-J)** Metáfases mitóticas em *E. elegans* com $2n = 20$ e *E. flavescens* ambas com $2n = 20$, *E. filiculmis* com $2n = 30$, *E. montana* com $2n = 40$ e *E. niederleini* com $2n = 42$, respectivamente. As setas destacam as variações intracariotípicas, apontando os maiores e menores cromossomos, derivados de rearranjos. Barra = 10 μm 38
- Figura 4.** **(A)** Distribuição relativa (%) das classes de DNAs repetitivos nos genomas de *E. elegans* e *E. geniculata*. Note que os elementos de Classe I são predominantes em relação aos de Classe II. **(B)** Distribuição relativa (%) das superfamílias *Copia* e *Gypsy* nos genomas de *E. elegans* e *E. geniculata*. Observe que os clados Sirevirus de *Copia* e Tat/Athila de *Gypsy* predominam nos dois genomas 41
- Figura 5.** Gráfico de aproximação genética das regiões conservadas da transcriptase reversa de *E. elegans* (EE), juntamente com as referências de cada linhagem do GypsyDB. O clado Sirevirus (Oryco, Sire e Retrofit) da superfamília *Copia* aparece destacada em azul claro, e clado Tork em azul escuro. As linhagens do clado Cromovirus (Del, Reina e CRM) de *Gypsy* estão representadas pela cor amarelo clara, e o clado Athila/Tat aparecem em amarelo escuro 42
- Figura 6.** Gráfico de aproximação genética das regiões conservadas da transcriptase reversa de *E. geniculata* (EG), juntamente com as referências de cada linhagem do GypsyDB. O clado Sirevirus (Oryco, Sire e Retrofit) da superfamília *Copia* e o clado Tork, aparecem destacados em verde. As linhagens do clado Cromovirus (Del, Reina e CRM) e o clado Athila/Tat, de *Gypsy* aparecem em amarelo 42

- Figura 7.** Hibridização *in situ* fluorescente com metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de INT-Oryco detectada com avidina-FITC (verde), em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-E)** *E. maculosa* com $2n = 10$ com sinais dispersos e a formação de pequenos blocos em pelo menos quatro cromossomos, evidenciando também os sinais no núcleo. **(F – H)** *E. elegans* com $2n = 20$, **(I-K)** *E. montana* $2n = 40$ e **(L-N)** *E. niederleinii* $2n = 42$. Observe que essas espécies essas sondas produziram mais sinais dispersos do que em *dots*. Barra = $10\mu\text{m}$ 46
- Figura 8.** Hibridização *in situ* fluorescente com metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de RT-Sire detectada com avidina-FITC (verde), em três espécies de *Eleocharis*. A FISH produziu sinais principalmente dispersos. **(A e B)** *E. elegans* com $2n = 20$, com sinais dispersos e pequenos *dots* em dois cromossomos (setas). **(C e D)** *E. montana* $2n = 40$, mostrando sinais mais intensos e dispersos em metade dos cromossomos, mas também com *dots* (seta). **(E-G)** *E. niederleinii* com $2n = 42$, e sinais mais acúmulos nos quatro cromossomos maiores, e sinais mais finos em dispersos nos demais cromossomos. Barra = $10\mu\text{m}$ 47
- Figura 9.** Hibridização *in situ* fluorescente metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de RNaseH-CRM detectada com Cy3-dUTP (vermelho), em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-D)** *E. maculosa* com $2n = 10$, destaca dois cromossomos com sinais dispersos ao longo das cromátides exceto nas extremidades, e sinais dispersos nos demais. **(E-G)** *E. elegans* com $2n = 20$ com sinais dispersos **(H-J)** *E. montana* $2n = 40$ mostrando 22 cromossomos com sinais dispersos e de brilho intenso, e outros com sinais fracos ou ausentes. **(K-M)** Em *E. niederleinii* $2n = 42$, os sinais foram dispersos e mais intensos nos quatro cromossomos maiores e em seis cromossomos menores. Note que os demais apresentam sinais dispersos e mais fracos. Barra = $10\mu\text{m}$ 48

- Figura 10.** Hibridização *in situ* fluorescente em metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de INT-DEL detectada com antidig-rodamina e Cy3-dUTP (vermelho), em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-C)** *Eleocharis maculosa* com $2n = 10$, com sinais dispersos em todos os cromossomos. **(D-F)** *E. elegans* com $2n = 20$, sinais dispersos e com *dots* em dois cromossomos **(G-I)** Em *E. montana* com $2n = 40$ pelo menos doze cromossomos mostraram sinais dispersos mais intensos e os demais sinais mais fracos. **(J-L)** Em *E. niederleinii* ($2n = 42$) os sinais aparecem mais acumulados nos quatro maiores, e em dois desses os sinais foram mais fracos (setas), além de sinais intensos em outros quatro menores. Pontas de seta indicam regiões de heterocromatina constitutiva sem sinais de hibridização. Barra = 10 μ m..... 49
- Figura 11.** Hibridização *in situ* fluorescente em metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sondas de INT-Athila e RT-Tat foram marcadas com Cy3-dUTP (vermelho), e hibridizadas conjuntamente em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-C)** *Eleocharis elegans* com $2n = 20$, com sinais em blocos em todos os cromossomos e pequenos *dots*. **(D-F)** *E. flavescens* $2n = 20$, com sinais em blocos intersticiais em sua maioria, e com *dots* terminais. **(G-I)** Em *E. montana* ($2n = 40$) aparece um grande número de sinais em blocos em todos os cromossomos ao contrário de *E. niederleinii* $2n = 42$ **(J-L)** onde sinais fracos e dispersos foram observados, exceto pelos cromossomos maiores que possuem sinais fortes ao longo de toda extensão (pontas de seta). As setas apontam para *dots* terminais. Barra = 10 μ m..... 50
- Figura suplementar 1.** Produtos das PCRs com *primers* para linhagens de retrotransposons. **(A) 1 a 5** *E. montana* com *primers* Oryco, Del, Athila, CRM, Tat; **6 a 9** *E. elegans* com *primers* Del, Athila, CRM e Tat; **10 a 13** *E. flavescens* com *primers* Oryco, Sire, Del e Tork, respectivamente, onde: M = Marcador de 100pb..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Comparação de conteúdo de DNA de <i>Eleocharis</i> usando citometria de fluxo e análise cariotípica	35
Tabela 2.	Dados da montagem dos <i>assemblies</i> em <i>E. geniculata</i> e <i>E. elegans</i> , usando o programa Velvet	39

LISTA DE ABREVIÇÕES

cDNA	DNA complementar
DIRS	sequências intermediárias repetidas de <i>Dictyostelium</i> (<i>Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNA _r	DNA ribossômico
DNA _{sat}	DNA satélite
ETs	elementos transponíveis
FISH	hibridização in situ (<i>fluorescent in situ hybridization</i>)
INT	integrase
LINE	sequências longas interespaçadas (<i>long interspersed nuclear element</i>)
LTR	sequências terminais repetidas (<i>long terminal repeat</i>)
Mpb	mega pares de base
NGS	sequenciamento de próxima geração (<i>next generation sequencing</i>)
pb	pares de base
pg	picogramas
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
POL	cadeia poligênica (<i>Poligenic chain</i>)
PR	protease
RH	RNAseH
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	transcriptase reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
SINE	sequências curtas interespaçadas (<i>short interspersed nuclear element</i>)
SSR	microssatélite (<i>simple sequence repeat.</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	13
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	<i>Cromossomos holocêntricos</i>	14
2.2	<i>Citogenética e conteúdo de DNA em Cyperaceae e no gênero Eleocharis</i>	15
2.3	<i>DNAs repetitivos</i>	17
2.4	<i>Citogenômica</i>	18
3.	OBJETIVOS	20
3.1	<i>Geral</i>	20
3.2	<i>Específicos</i>	20
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
	ARTIGO	26
	Introdução	27
	Material e métodos	28
	Resultados	33
	Discussão	51
	Considerações finais	56
	Agradecimentos	57
	Referências bibliográficas	57
	Anexo 1	62
	Anexo 2	63
	CONCLUSÕES FINAIS	64

1. INTRODUÇÃO

Os genomas vegetais possuem uma grande variação no conteúdo de DNA em Mpb, principalmente pelo acúmulo diferencial de DNAs repetitivos e pela poliploidia (BENNETZEN, 2002). DNAs repetitivos, que podem ser organizados tanto pelo tamanho das repetições quanto pelas funções nucleotípicas, variam de acordo com a origem e a composição de bases, sendo os elementos de transposição (ETs) os mais abundantes nos genomas vegetais (JURKA et al., 2007). O acúmulo e a diminuição no número dessas sequências são parâmetros utilizados no estudo da evolução dos genomas e, por consequência, da variabilidade genética (EVGEN'EV, 2007). Alguns estudos mostraram que os elementos de transposição são importantes para o aumento da diversidade genética, bem como para a regulação e formação de novos genes (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007; LISCH, 2013; BENNETZEN; WANG, 2014; MAKAREVITCH et al., 2015).

A família Cyperaceae é um bom modelo para análises em citogenômica, porque suas espécies têm cromossomos holocêntricos, os quais não seguem o arranjo de Rabl que organiza os territórios no núcleo interfásico no sentido centrômeros para um polo e telômeros para o outro, como ocorre com os monocêntricos. A dinâmica de dispersão equilocal de sequências, em holocêntricos, parece ser dependente do tamanho cromossômico e não da posição de um centrômero localizado (GUERRA et al., 2006). Além disso, esses cromossomos estão mais sujeitos a fixar eventos de disploidia (quebra e fusão) quando comparados aos sistemas monocinéticos (LUCENÑO; GUERRA, 1996; VANZELA et al., 2003; DA SILVA et al., 2008). Além dos holocêntricos tornarem os genomas mais tolerantes a variação cromossômica, decorrente de rearranjos estruturais, a condição holocinética permite que fragmentos cromossômicos gerados não sejam, em regra, perdidos nas divisões celulares subsequentes (VANZELA; COLAÇO, 2002).

O gênero *Eleocharis* R. Br. pertence à família Cyperaceae (SVENSON, 1929; GONZÁLEZ-ELIZONDO; PETERSON, 1997) e mostra uma variação numérica de $2n = 6$ em *E. subarticulata* (DA SILVA et al., 2005) a $2n = 196$ em *E. huroguwai* (HOSHINO, 1987). Há vários registros de variações intraespecíficas tanto para disploidia quanto para poliploidia (LUCENÑO; GUERRA, 1996; DA SILVA et al., 2008; DA SILVA et al., 2010a), assim como uma variação no tamanho dos genomas de 0,84 pg em *E. cellulosa* a 18 pg em *E. sternerii* (ZEDEK et al., 2010).

Diante disso, há uma demanda para avaliar comparativamente os genomas em *Eleocharis*, sobretudo para responder questões sobre a diversidade da fração repetitiva de DNA. Assim, pretendemos: i) caracterizar e comparar dois genomas de *Eleocharis* parcialmente sequenciados quanto a ocorrência de DNAs repetitivos, ii) caracterizar e comparar as linhagens de retrotransposons das superfamílias *Gypsy* (Reina, Galadriel, Del, CRM, Athila e Tat) e *Copia* (Oryco, Retrofit, Sire e Tork) nesses dois genomas, iii) relacionar a quantidade de linhagens dos *assemblies* e do padrão de sinais de FISH com conteúdo de DNA em picogramas (pg), em sete espécies e iv) checar a distribuição cromossômica entre linhagens e entre espécies usando hibridização *in situ* com sondas heterólogas. Com isso, pretendemos também responder as seguintes questões: Cariótipos contrastantes são acompanhados por acumulação ou perda diferencial dos retrotransposons? ii) Variações nos tamanhos dos genomas são acompanhados por variações na ocorrência de retrotransposons? Se sim, quais linhagens se destacam? iii) Cromossomos holocêntricos possuem regiões específicas (*hotspots*) para ocorrência diferenciada de retrotransposons, haja vista a ausência de constrição primária?

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

2.1. Cromossomos holocêntricos

Os cromossomos holocêntricos surgiram de forma independente nos eucariontes. Cerca de 800 espécies apresentam esse tipo de cromossomos, entre plantas, insetos, aracnídeos e nematóides (MELTERS et al., 2012). Em plantas, esses cromossomos estão presentes em angiospermas, predominantemente nas monocotiledôneas Juncaceae e Cyperaceae (LUCENÑO et al., 1998; MELTERS et al., 2012).

O centrômero é uma região cromossômica onde estão localizadas as proteínas do cinetócoro, e tem importante papel na cinética das divisões celulares. O nome “holocêntrico” foi adotado para aqueles cromossomos que não exibem uma constrição primária, mas que possuem os cinetócoros distribuídos ao longo das cromátides, se estendendo entre as regiões terminais (NAGAKI et al., 2005; GUERRA et al., 2010; MARQUES et al., 2015; WANNER et al., 2015). Para alguns grupos, como em *Rhynchospora*, a organização física dos holocentrômeros pode alterar de contínua a linear ao longo das cromátides em mitose, para agrupada em meiose (MARQUES et al., 2016a). Essa configuração é diferente daquela

encontrada nos cromossomos monocêntricos, os quais possuem as proteínas centroméricas localizadas em uma região restrita, formando a constrição primária (MA et al., 2007; FENG et al., 2015). Na mitose dos holocêntricos, a ligação dos microtúbulos aparece distribuída ao longo do comprimento das cromátides (NAGAKI; KASHIHARA; MURATA, 2005; GUERRA et al., 2010), diferentemente do que ocorre em monocêntricos. Nesse sentido os holocêntricos são mais tolerantes aos eventos de fissão e fusão, porque fragmentos gerados manteriam atividade cinetocórica (VANZELA; COLAÇO, 2002). Assim, há uma maior flexibilidade intra e interespecífica para variações nos números e tamanhos dos cromossomos (ROALSON, 2008; BUREŠ; HIPPI; ESCUDERO, 2013; ZEDEK, 2014). Este panorama remete a uma questão que ainda está por ser solucionada: Variações cariotípicas decorrente de disploidia e/ou poliploidia podem ser detectáveis em análises comparativas de conteúdos de DNA? Outros fatores poderiam interferir, como por exemplo atividades diferenciais dos elementos de transposição?

2.2 Citogenética e conteúdo de DNA em Cyperaceae e no gênero *Eleocharis*

A família Cyperaceae é cosmopolita, com maior diversidade em regiões de clima húmido e semiúmidas. Esta compreende 109 gêneros com mais de 5.500 espécies, sendo que ~2.000 pertencem ao gênero *Carex* (GOETGHEBEUR, 1998). As ciperáceas possuem características citológicas pouco comuns quando comparadas com as demais angiospermas como: i) ocorrência de pseudomônades, que são resultantes de microsporogênese com tétrade assimétrica, e a formação de apenas um grão de pólen devido a degeneração dos outros três por morte celular programada (BROWN; LEMMON, 2000; SAN MARTIN et al., 2013; ROCHA et al., 2016), ii) meiose pós-reducional, na qual ocorre a divisão das cromátides irmãs na primeira meiose, inverso ao que ocorre na meiose reducional (HECKMANN et al., 2014; MARQUES et al., 2016b) e iii) cromossomos holocêntricos, que não apresentam centrômero localizado (NAGAKI; KASHIHARA; MURATA, 2005; HIPPI et al., 2009). Cyperaceae é marcada por uma grande diversidade tanto intra quanto interespecífica nos números cromossômicos, decorrente de eventos de disploidia e poliploidia. No gênero *Carex*, por exemplo, as quebras (agmatoploidia) e fusões (simploidia) parecem ser mais comuns (LUCENO; CASTROVIEJO, 1991; CHUNG et al., 2011), enquanto que em gêneros como *Rhynchospora* e *Eleocharis*, a poliploidia tem maior importância, embora as disploidias também ocorram (DA SILVA et al., 2008; DA SILVA et al., 2010a; ARGUELHO et al., 2012). No gênero *Schoenoplectus*, por exemplo, há uma variação cromossômica ligada a disploidias e poliploidia, além de um caso raro de mixoploidia poliploide, onde em um único

indivíduo de *Schoenoplectus acutus* var. *occidentalis* foram encontradas células com $2n = 38$ e $2n = 84$ (TENA-FLORES et al., 2014).

O gênero *Eleocharis* tem cerca de 200 espécies que são reconhecidas morfológicamente pelas folhas reduzidas a bainhas tubulares, base do estilo persistente e inflorescência reduzida a uma espigueta terminal (GONZÁLEZ-ELIZONDO; PETERSON, 1997). As espécies desse gênero são divididas em quatro subgêneros: *Limnochloa*, *Eleocharis*, *Scirpidium* e *Zinserlingia* (GONZÁLEZ-ELIZONDO; PETERSON, 1997), porém, apenas os três primeiros ocorrem na América do Sul. Em termos citogenéticos, as espécies de *Eleocharis* e *Scirpidium* se diferenciam das espécies de *Limnochloa* por possuírem cromossomos maiores e com gradiente de tamanho, em contraste aos cromossomos menores e numerosos de *Limnochloa* (YANO et al., 2004; DA SILVA et al., 2010a). Assim como acontece com as demais ciperáceas, os cromossomos holocêntricos em *Eleocharis* (HÅKASSON, 1954) têm possibilitado variações numéricas decorrente de disploidia e poliploidia. Roalson (2008), estudou cerca de 50 espécies desse gênero e encontrou números múltiplos de $n = 5, 10$ e 15 . Da Silva et al. (2010), também mostraram ampla variação cromossômica numérica, e destacaram, por exemplo, variações intraespecíficas em *Eleocharis sellowiana* e *E. geniculata*, com $2n = 10$ e 20 , decorrentes de poliploidia. Em outro estudo, em *E. maculosa*, Da Silva et al. (2008) mostraram que a simploidia é o processo responsável pela redução cromossômica nesta espécie ($2n = 10, 8, 7$ e 6). A redução no número cromossômico também foi reportada para *E. subarticulata* (DA SILVA et al., 2005), onde $2n = 6$ parece ter sido originado por translocações múltiplas, evidenciada por um anel multivalente na meiose.

Outro fato que chama a atenção em *Eleocharis*, é a acumulação diferencial de sequências de DNAr 45S em múltiplos sítios cromossômicos terminais, enquanto que os sítios de DNAr 5S são em sua maioria intersticiais e em número reduzido (DA SILVA et al., 2010b). Múltiplos sítios terminais de DNAr 45S não são uma exclusividade dos genomas de *Eleocharis*, uma vez que foram reportados também em *Rhynchospora* e outros gêneros de Cyperaceae (VANZELA et al., 1998; SOUSA et al., 2011).

Tais variações cromossômicas parecer ter reflexos no conteúdo de DNA genômico em *Eleocharis*. De acordo com Zedek et al. (2010), o tamanho dos genomas neste gênero é variável, de 0,84 a 18pg. Desse modo, tanto o número cromossômico quanto o conteúdo de DNA podem ser importantes para a análises genômicas e taxonômicas. Uma das maneiras de estimar o valor C de DNA é por citometria de fluxo. Esse procedimento permite verificar quantitativamente a presença de biomoléculas conjugadas com fluorocromos, sendo

útil para lidar com células, separar cromossomos, analisar as divisões celulares, comparar conteúdos de DNA nuclear, avaliar apoptose e necrose (GIVAN, 2011). Suspensões de células ou núcleos preparados por dissecação do material biológico podem ser tratadas com RNase e coradas com iodeto de propídeo, e sua fluorescência medida. O preparo do tecido é fácil e uma grande população de núcleos pode ser medida em poucos minutos (DOLEZEL et al., 2007).

Chung et al. (2011) empregaram este procedimento em um estudo comparativo em *Carex scoparia var. scoparia*. Esses autores encontraram uma variação no número cromossômico de $2n = 62$ a $2n = 68$, a qual não tem correlação com o tamanho dos genomas. A explicação foi que em *Carex* há mais influência de eventos de fissão de fusão, do que processos de duplicação e deleção. Algo similar foi reportado por Roalson et al. (2007), usando números cromossômicos para outras espécies da ordem Cyperales, como *Rhynchospora*, *Eleocharis*, *Luzula*, *Scirpus*, entre outros gêneros. Esses autores também encontraram uma correlação negativa entre número cromossômico e conteúdo de DNA.

2.3 DNAs repetitivos

A maior parte dos genomas vegetais é composta por DNA repetitivo, que podem estar organizados em blocos ou dispersos pelo genoma (BENNETZEN, 2000; HESLOP-HARRISON; SCHMIDT, 2007, 2011). Sequências repetidas em blocos englobam: i) microsátélites (1-10 pb) e minisátélites (10-100 pb), que podem ser amplificados/dispersados nos cromossomos por *slippage* e ii) DNAs satélites (>100 pb), que configuram sequências altamente repetidas, de replicação tardia, associadas às regiões de heterocromatina. Essas podem alcançar milhões de cópias, podendo se movimentar nos cromossomos por dispersão equilocal e equidistante (ELLEGREN, 2004; HEMLEBEN et al., 2007; ZAKRZEWSKI et al., 2010; BARDELLA et al., 2014).

Dentre as sequências repetidas codificadoras encontram-se os elementos de transposição (ETs). Esses ocorrem predominantemente dispersos pelo genoma e são os mais numerosos devido principalmente ao mecanismo de movimentação (JURKA et al., 2007). Esses elementos foram propostos pela primeira vez por Barbara McClintock, a partir de estudos do efeito de variação em sementes de milho (MC CLINTOCK, 1951). O acúmulo de ETs pode influenciar no tamanho dos genomas, devido a variação em número de cópias, de acordo com a espécie (LEE; KIM, 2014). A atividade dos ETs pode levar a recombinação desigual causando reorganização cromossômica de pequena ou de grandes proporções, ou

causar outros efeitos como a inativação e a criação e regulação de genes (BENNETZEN; WANG, 2014; CHAPARRO et al., 2015).

ETs que realizam a transposição por meio de um RNA intermediário pertencem a Classe I, e são chamados de retrotransposons. Neste processo, uma cópia de cDNA gerada pela transcriptase reversa é inserida no genoma alvo. Retrotransposons podem ser divididos em cinco ordens: LTR retrotransposons, DIRS, PLE, LINEs e SINEs (JANICKI et al., 2011). Os elementos de Classe II, que compreende os transposons, utilizam uma molécula de DNA no processo corta/cola, onde a transposição é mediada pela enzima transposase. Nesse caso, o segmento é excisado de um local e inserido em outro. Nessa classe estão inclusos, além dos transposons, os Helitrons e Polintons (WICKER et al., 2007). Os elementos de transposição podem também ser classificados como autônomos, quando possuem todas as enzimas necessárias para a transposição de modo independente, enquanto que os não autônomos utilizam os componentes codificados pelos autônomos para realizar a transposição (JURKA et al., 2007).

Os retrotransposons com LTR são os mais representativos nos genomas vegetais, e são classificados em duas superfamílias *Copia* e *Gypsy*. Essas se diferem pela ordem da proteína integrase na cadeia poligênica (POL), sendo em *Gypsy* (PR-RT-RH-INT) e em *Copia* (PR-INT-RT-RH) (LLORENS et al., 2009). As relações entre essas superfamílias são usualmente estabelecidas com base em análises de sequências de RT, e são divididas em linhagens, como por exemplo, Sire, Oryco, Retrofit (sirevirus) e Tork em *Copia*, e CRM, Galadriel, Reina (Cromovirus) e Athila/Tat em *Gypsy* (EICKBUSH; JAMBURUTHUGODA, 2008; LLORENS et al., 2009).

Nos genomas das plantas, os ETs podem compreender até 80% do DNA total, como em milho e em outras monocotiledôneas dos gêneros *Oryza* e *Sorghum*, (MEYERS et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2005; DEVOS, 2010). No genoma de *Musa* (banana), os elementos de transposição correspondem a mais de 40% dos *assemblies* mapeados (D'HONT et al., 2012) e em *Gossypium* (algodão), são mais de 60% (LIU et al., 2016).

2.4 Citogenômica

A citogenética molecular possibilita a realização de estudos sobre a estrutura cromossômica de maneira mais detalhada, usando uma associação de técnicas convencionais, moleculares e de bioinformática, permitindo assim caracterizar e localizar de

maneira simultânea e mais eficiente, genes, sequências repetitivas, cromossomos isolados, assim como genomas inteiros (KATO et al., 2005; DANILOVA; BIRCHLER, 2008; MARQUES et al., 2015; SANTOS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

O sequenciamento de próxima geração (NGS) possibilitou conhecer frações de vários genomas vegetais por meio da montagem de milhões de leituras curtas, com subsequente varredura do *assemblies* contra bancos de dados livres. O sequenciamento Illumina, por exemplo, gera arquivos de saída com milhões de sequências com 100 a 300 pb, a depender do sequenciador utilizado. Esses dados podem ser tratados com diversas ferramentas de bioinformática, para a obtenção de sequências maiores (montagem), o que possibilita a busca por identidade em bancos de dados (METZKER, 2010). A citogenômica é uma prática na qual tais sequências podem ser empregadas em uma abordagem citológica, visando o estudo da biologia cromossômica e nuclear focando, por exemplo, na diversidade de famílias de DNA repetitivo de diferentes naturezas. Há vários exemplos onde a citogenômica foi empregada com sucesso no estudo da evolução genômica e cromossômica em plantas.

Zakrzewski et al. (2010), por exemplo, usaram análises de bioinformática e FISH para verificar a amplificação e distribuição de minisatélites em *Beta vulgaris*. Esses autores observaram sequências de moderada a altamente repetitivas, com sinais dispersos em regiões heterocromáticas nos cromossomos. Heckmann et al. (2013) estudaram a distribuição de sequências repetitivas nos cromossomos holocêntricos de *Luzula elegans*, e observaram que os retrotransposons da superfamília *Copia* são os mais representativos no genoma, com sequências distribuídas de maneira dispersa nos cromossomos. Santos et al. (2015), buscaram retrotransposons ativos de *Brachiaria decumbens* em um transcriptoma de raiz, focando em regiões proteicas conservadas da cadeia poligênica. Esses autores conseguiram identificar e localizar *in situ* linhagens de *Gypsy* entre espécies diploides e poliploides, mostrando um acúmulo diferencial de cada linhagem ao longo dos cromossomos, tanto em blocos quanto dispersos.

3. OBJETIVOS:

3.1. Geral

O objetivo deste estudo foi comparar e caracterizar a ocorrência de elementos transposição em dois genomas de *Eleocharis* (Cyperaceae), bem como entender o papel dos retrotransposons no processo de diferenciação genômica e cariotípica nessas espécies com cromossomos holocêntricos.

3.2 Específicos

- a. Analisar os cariótipos de sete espécies do gênero *Eleocharis*;
- b. Obter o valor C de DNA para comparar os níveis de ploidia com a frequência de retrotransposons nas sete espécies de *Eleocharis*;
- c. Buscar e comparar a frequência dos elementos de transposição nos genomas de *Eleocharis elegans* e *E. geniculata*;
- d. Alinhar os *assemblies* com trechos da transcriptase reversa, integrase e RNase H, para construção de gráficos de aproximação e selecionar as melhores sequências;
- e. Desenhar *primers* das regiões conservadas dos domínios proteicos de linhagens de retrotransposons das superfamílias *Copia* e *Gypsy*; para produção de sondas;
- f. Localizar os retrotransposons por FISH e fazer uma análise comparativa de sua ocorrência entre as espécies e linhagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGUELHO, E. G. et al. New chromosome counts in Brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Caryologia**, v. 65, n. 2, p. 140–146, 2012.
- BARDELLA, V. B.; DA ROSA, J. A.; VANZELA, A. L. L. Origin and distribution of AT-rich repetitive DNA families in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 106–114, 2014.
- BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 251–269, 2000.
- BENNETZEN, J. L. Mechanisms and rates of genome expansion and contraction in flowering plants. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 29–36, 2002.
- BENNETZEN, J. L.; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 505–30, 2014.
- BROWN, R. C.; LEMMON, B. E. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae). **American Journal of Botany**, v. 87, n. 1, p. 1–11, 2000.
- BUREŠ, P.; ZEDEK, F. Holokinetic drive: Centromere drive in chromosomes without centromeres. **Evolution**, v. 68, n. 8, p. 2412–2420, 2014.
- CHAPARRO, C. et al. Terminal-Repeat Retrotransposons with GAG Domain in Plant Genomes: A New Testimony on the Complex World of Transposable Elements. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 493–504, 2015.
- CHUNG, K. S.; WEBER, J. A.; HIPPI, A. L. Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, Cyperaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 1, p. 122–129, 2011.
- DA SILVA, C. R.M; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M.S; VANZELA, A.L.L. Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 149, n. 4, p. 457-464, 2005.
- DA SILVA, C. R.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L.L. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 2, p. 175-180, 2008.
- DA SILVA, C. R. M. et al. Karyotypic diversification and its contribution to the taxonomy of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Brazil. **Australian Journal of Botany**, v. 58, n. 1, p. 49-60, 2010a.
- DA SILVA, C. R. M. et al. Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Genetica**, v. 138, n. 9-10, p. 951-957, 2010b.

- DANILOVA, T.V.; BIRCHLER, J.A. Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development. **Chromosoma**, v. 117, n. 4, p. 345-356, 2008.
- DEVOS, K. M. Grass genome organization and evolution. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 2, p. 139-145, 2010.
- D'HONT, A. et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. **Nature**, v. 488, n. 7410, p. 213–217, 2012.
- DOLEZEL, J. et al. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233–2244, 2007.
- EICKBUSH, T. H.; JAMBURUTHUGODA, V. K. The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. **Virus Research**, v. 134, n. 1–2, p. 221–234, 2008.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.
- EVGEN'EV, M. B. Mobile elements and genome evolution. **Molecular Biology**, v. 41, n. 2, p. 234–245, 2007.
- FENG, C. et al. Recent advances in plant centromere biology. **Science China. Life sciences**, v. 58, n. 3, p. 240–5, 2015.
- GIVAN, A. L. Flow cytometry: an introduction. In **Flow Cytometry Protocols**. Humana Press, 2011.
- GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. **The families and genera of vascular plant: IV. Flowering plants – monocotyledons.**, p. 141–190, 1998.
- GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; PETERSON, P. M. A classification of and key to the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). **Taxon**, v. 46, n. 3, p. 433–449, 1997.
- GUERRA, M. et al. Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 33-41, 2006.
- GUERRA, M. et al. Neocentrics and holokinetics (holocentrics): Chromosomes out of the centromeric rules. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 129, n. 1–3, p. 82–96, 2010.
- HÅKANSSON, ARTUR. Meiosis and pollen mitosis in x-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. **Hereditas**, v. 40, n. 3-4, p. 325-345, 1954.
- HECKMANN, S. et al. The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. **The Plant Journal**, v. 73, n. 4, p. 555-565, 2013.
- HECKMANN, S. et al. Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. **Nature Communications**, v. 5, p. 4979, 2014.

- HEMLEBEN, V. et al. The Natural History Museum Plant highly repeated satellite DNA : molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. **Systematics and Biodiversity**, v. 5, n. 3, p. 277–289, 2007.
- HESLOP-HARRISON, J. S. SCHMIDT, T. Plant Nuclear Genome Composition. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–8, 2007.
- HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18–33, 2011.
- HIPP, A. L. et al. The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). **Botanical Review**, v. 75, n. 1, p. 96–109, 2009.
- HIPP A.L.; ESCUDERO M. **Holocentric Chromosomes**, v. 3, p. 499–501, 2013.
- HOSHINO, T. Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. **Bulletin of Okayama University Science**, v. 22, p. 305–312, 1987.
- JANICKI, M.; ROOKE, R.; YANG, G. Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. **Chromosome research**, v. 19, n. 6, p. 787, 2011.
- JURKA, J. et al. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 8, p. 241–259, 2007.
- KATO, A. et al. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. **Current opinion in plant biology**, v. 8, n. 2, p. 148–154, 2005.
- LEE, Sung-II; KIM, Nam-Soo. Transposable elements and genome size variations in plants. **Genomics & informatics**, v. 12, n. 3, p. 87–97, 2014.
- LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? **Nat Rev Genet**, v. 14, n. 1, p. 49–61, 2013.
- LIU, Y. et al. A *Gossypium* BAC clone contains key repeat components distinguishing sub-
- LLORENS, C. et al. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. **Biology direct**, v. 4, p. 41, 2009.
- LUCEÑO, M. ; CASTROVIEJO, S. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. v. 177, p. 149–159, 1991.
- LUCEÑO, M.; GUERRA, M. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: A nomenclatural proposal. **Caryologia**, v. 49, n. 3–4, p. 301–309, 1996.
- LUCEÑO, M.; VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. **Canadian Journal of Botany**, v.76, p. 440–449, 1998.

- MA, J. et al. Plant centromere organization : a dynamic structure with conserved functions. **TRENDS in genetics**, v. 23, n. 3, 2007.
- MAKAREVITCH, I. et al. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2015.
- MARQUES, A. et al. Correction for Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 44, p. 13633–13638, 2015.
- MARQUES, A. et al. Restructuring of Holocentric Centromeres During Meiosis in the Plant *Rhynchospora pubera*. **Genetics**, v. 204, n.2, 2016a.
- MARQUES, A.; PEDROSA-HARAND, A. Holocentromere identity: from the typical mitotic linear structure to the great plasticity of meiotic holocentromeres. **Chromosoma**, v. 125, n. 4, p. 669-681, 2016b.
- MATSUMOTO T, et al: The map-based sequence of the rice genome. **Nature**, v.326,p. 793-800, 2005.
- MCCLINTOCK, B. Chromosome organization and genic expression. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1951. p. 13-47.
- MELTERS, D. P. et al. Holocentric chromosomes: Convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research**, v. 20, n. 5, p. 579–593, 2012.
- METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.
- MEYERS, B. C.; TINGEY, S. V.; MORGANTE, M.. Abundance, distribution, and transcriptional activity of repetitive elements in the maize genome. **Genome Research**, v. 11, n. 10, p. 1660-1676, 2001.
- NAGAKI, K.; KASHIHARA, K.; MURATA, M. Visualization of Diffuse Centromeres with Centromere-Specific Histone H3 in the Holocentric Plant *Luzula nivea*. **Plant Cell**, v. 17, p. 1886–1893, 2005.
- RIBEIRO, T. et al. Centromeric and non-centromeric satellite DNA organisation differs in holocentric *Rhynchospora* species. **Chromosoma**, 2016.
- ROALSON, E. H.; MCCUBBIN, A. G.; WHITKUS, R.. Chromosome evolution in Cyperales. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n. 1, p. 62-71, 2007.
- ROALSON, E. H. A synopsis of chromosome number variation in the cyperaceae. **Botanical Review**, v. 74, p. 209-393, 2008.
- ROCHA, D. M. et al. Developmental programmed cell death during asymmetric microsporogenesis in holocentric species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Journal of Experimental Botany**, p. 1-11, 2016.

- SANTOS, F. C. et al. Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. **Chromosome Research**, v. 23, n. 3, p. 571–582, 2015.
- SAN MARTIN, J. A. B., et al. Asymmetric cytokinesis guide the development of pseudomonads in *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). **Cell Biology International**, v. 33, p. 1118-1118, 2013.
- SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 272–85, 2007.
- SOUSA, A. et al. Distribution of 5S and 45S rDNA sites in plants with holokinetic chromosomes and the “chromosome field” hypothesis. **Micron**, v. 42, n. 6, p. 625-631, 2011.
- SVENSON. H.K.; HARVARD UNIVERSITY. GRAY. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University, n. 86, p. 121–242, 1929.
- TENA-FLORES, J. A. et al. Karyotype characterization of four Mexican species of *Schoenoplectus* (Cyperaceae) and first report of polyploid mixoploidy for the family. **Caryologia**, v. 67, n. 2, p. 124-134, 2014.
- VANZELA et al. Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Chromosome Research**, v. 6, n. 5, p. 345-350, 1998.
- VANZELA, A. L. L.; COLAÇO, W. Mitotic and meiotic behavior of γ irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 611-614, 2002.
- VANZELA, A.L.L; CUADRADO, A.; GUERRA, M.. Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 199-201, 2003.
- WICKER, T. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973–982, 2007.
- YANO, O. et al. Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. **Journal of Plant Research**, v. 117, n. 5, p. 409–419, 2004.
- ZAKRZEWSKI, F. et al. Analysis of a c0t-1 library enables the targeted identification of minisatellite and satellite families in *Beta vulgaris*. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 8, 2010.
- ZEDEK, F. et al. Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 1-10, 2010.
- WANNER, G. et al. The ultrastructure of mono- and holocentric plant centromeres: an immunological investigation by structured illumination microscopy and scanning electron microscopy. **Chromosoma**, v. 124, p. 503–517, 2015.

Artigo a ser submetido para a revista **Annals of Botany**.

Contribuição dos LTRs-RTs na organização e diferenciação cariotípica em espécies holocêntricas de *Eleocharis*

Thaíssa Boldieri de Souza¹, André Luís Laforga Vanzela^{1*}

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

*E-mail: andrevanzela@uel.br

Resumo

As sequências repetitivas são os principais componentes dos genomas das plantas. Elementos transponíveis (ETs), que constituem a parte móvel dos genomas, são divididos em duas classes principais (Classe I e Classe II) de acordo com seu modo de transposição. Elementos de Classe I, ou retrotransposons, são sintetizados e transpostos usando um RNA intermediário. Devido ao seu modo de replicação, os retrotransposons aparecem mais acumulados nos genomas e as suas linhagens podem acumular-se diferencialmente dependendo do grupo vegetal. As espécies de *Eleocharis* possuem cromossomos holocêntricos, que tornam os cariótipos mais tolerantes aos eventos de disploidia, e que podem estar associados ao estresse genômico e à expressão dos elementos transponíveis. Nosso objetivo foi comparar a ocorrência e a distribuição cromossômica de diferentes linhagens *Copia* e *Gypsy* em cariótipos de espécies de *Eleocharis*, e associá-las com os valores de conteúdo de DNA. Foram escolhidas amostras com condições genômicas diferentes, considerando os níveis de ploidia, o valor do conteúdo de DNA e a presença de rearranjos cromossômicos. Para isso, foram utilizadas técnicas de quantificação de DNA por citometria de fluxo, análises genômicas e de citogenética molecular. Os genomas de *E. elegans* e *E. geniculata* foram parcialmente sequenciados por Illumina, os quais serviram como fonte para buscar proteínas conservadas de retrotransposons com LTR (LTR-RTs). Domínios de transcriptase reversa foram utilizados para reconhecer e comparar linhagens desses elementos e, juntamente com os domínios proteicos da integrase e RNaseH, foram utilizados para a construção de gráficos de aproximação genética e desenho de *primers* para a produção de sondas. Os dados do sequenciamento mostraram que as LTR-RTs foram a fração repetitiva mais abundante, com predominância dos membros dos clados Athila/Tat e Sirevirus. Os dados de citogenômica mostraram uma correlação positiva entre o aumento dos níveis de ploidia e a quantidade de DNA nuclear, atribuída principalmente à poliploidia, e não pelo efeito dos retrotransposons. O resultado da FISH mostrou uma distribuição predominantemente dispersa dos retrotransposons nos cromossomos, mas com diferenças claras na quantidade e localização física das linhagens de *Copia* e *Gypsy* entre espécies. Apesar desse estudo ter sido baseado em um sequenciamento de baixa cobertura, nossa estratégia foi útil para estudar a diversidade de LTR-RTs. Nossos resultados mostraram que, embora os retrotransposons apareçam diferentemente acumulados nesses genomas, não há uma distribuição atípica de LTR-RTs devido à condição holocinética, exceto para membros da linhagem CRM que apareceram distribuídos ao longo de cromátides holocentroméricas. Do mesmo modo, as diferenças no conteúdo de DNA podem ser atribuídas em menor intensidade à atividade e/ou ocorrência de retrotransposons, e de modo mais efetivo pela poliploidia.

Palavras-chave: citometria de fluxo, elementos de transposição, hibridização *in situ*, holocêntricos.

Introdução

Os genomas das plantas apresentam uma grande variação do conteúdo de DNA devido a poliploidia e a acumulação/eliminação de DNAs repetitivos (Bennetzen e Wang, 2014). A fração repetitiva de DNA pode ser reconhecida e organizada de acordo com tamanho das repetições, origem, composição de pares de bases e funções nucleotípicas. A natureza e a representatividade genômica dessas sequências podem ser utilizadas como parâmetros para estudos de variabilidade e evolução genética (Evgen'ev, 2007), bem como da biologia dos cromossomos e organização de cariótipos. Os elementos transponíveis (ETs) são as sequências repetitivas mais abundantes nos genomas das plantas (Grandbastien, 2015). Esses são divididos em duas classes principais de acordo com seu modo de transposição: Classe I (retrotransposons) que são sintetizados e transpostos por meio de um RNA intermediário, e Classe II (transposons), que promovem sua auto-transposição usando a transposase em um mecanismo conhecido como *cut-and-paste* (Jurka *et al.*, 2007; Wicker *et al.*, 2007). Os retrotransposons, que aparecem mais acumulados do que outros ETs, podem ser organizados em cinco ordens, LTR-retrotransposons (LTR-RT), DIRS, PLE, LINE e SINE (Janicki *et al.*, 2011). Esses elementos podem apresentar todas as enzimas necessárias para a transposição independente (autônomos), mas algumas delas não possuem a totalidade ou parte dos genes necessários à transposição independente (não-autônomos), forçando-os a se mover usando a maquinaria de elementos autônomos (Jurka *et al.*, 2007).

A quantidade de DNA nuclear de um dado organismo, normalmente referida como valor C de DNA tem sido reconhecida como um relevante parâmetro para caracterização genômica em plantas, podendo também auxiliar estudos evolutivos (Knight e Beaulieu, 2008), ecológicos, sistemáticos e de biologia molecular e celular (Bennet e Leitch, 1995). As flutuações nos valores C de DNA em espécies próximas podem ser indicativos de mobilização genômica, rearranjos cromossômicos e atividade diferencial associados aos ETs. Como por exemplo, a correlação positiva entre o acúmulo do retrotransposon BARE-1 e o aumento da quantidade de DNA vista em *Hordeum* (Kalendar *et al.*, 2000). Já em *Luzula* os eventos de disploidias parecem exercer um importante papel evolutivo na variação do número cromossômico e quantidade de DNA (Bozek *et al.*, 2012).

A família Cyperaceae é um bom modelo para análises em citogenômica, porque suas espécies têm cromossomos holocêntricos (Luceño *et al.*, 1998), os quais não seguem o arranjo de Rabl que organiza os territórios no núcleo interfásico no sentido centrômeros para um polo e telômeros para o outro, como ocorre com os monocêntricos. Além disso, esses

cromossomos são mais tolerantes a eventos de disploidias (quebra e fusão) quando comparados aos sistemas monocêntricos (Luceño e Guerra, 1996; Vanzela *et al.*, 2003; Da Silva *et al.*, 2008). A condição holocinética permite que fragmentos cromossômicos gerados sejam, em regra, mantidos nas divisões celulares subsequentes (Vanzela e Colaço 2002; Hipp e Escudero, 2013). O gênero *Eleocharis* R. Br. pertence à essa família (Svenson, 1929; González-Elizondo *et al.*, 1997) e mostra uma variação numérica de $2n = 6$ em *E. subarticulata* (Da Silva *et al.*, 2005) a $2n = 196$ em *E. huroguwai* (Hoshino, 1987). Há também registros de variações intraespecíficas tanto para disploidia quanto para poliploidia (Da Silva *et al.*, 2008), assim como uma variação no tamanho dos genomas de 0,84 pg em *E. cellulosa* a 18 pg em *E. sternerii* (Zedek *et al.*, 2010).

Diante disso, há uma demanda para avaliar comparativamente os genomas em *Eleocharis*, sobretudo para responder questões sobre a diversidade da fração repetitiva de DNA, associadas às alterações no tamanho dos genomas e nos números cromossômicos. Nossos objetivos foram caracterizar e comparar a ocorrência de DNAs repetitivos em dois genomas de *Eleocharis* parcialmente sequenciados, e utilizar regiões proteicas conservadas de retrotransposons *Copia* e *Gypsy*, para avaliar os processos de diferenciação genômica e cariotípica entre espécies próximas do subgênero *Eleocharis* de *Eleocharis*. E assim, aumentar nosso conhecimento sobre a organização dos cromossomos holocêntricos.

Material e Métodos

Material Vegetal

Foram utilizadas sete espécies de *Eleocharis* (*E. maculosa*, com duas populações, *E. geniculata*, com duas populações, *E. elegans*, *E. flavescens*, *E. filiculmis*, *E. montana* e *E. niederleinii*), todas pertencentes ao subgênero *Eleocharis* (Tabela 1). As espécies foram coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil, e identificadas de acordo com Trevisan (2009). As amostras foram mantidas na casa de vegetação do Laboratório de Citogenética e Diversidade Vegetal, CCB, da Universidade Estadual de Londrina.

Citometria de fluxo

A determinação do conteúdo de DNA nuclear foi feita com colmos jovens das setes espécies alvo, tendo como padrões duas espécies de Cyperaceae com valor C conhecido, *R. pubera* com $2C = 3,53\text{pg}$ e *Rhynchospora breviuscula* com $2C = 0,80\text{ pg}$ (Marques *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2016, respectivamente), além de uma espécie externa às ciperáceas, *Solanum lycopersicum* ‘*Stupické polní rané*’ ($2C = 1,96\text{ pg}$), a qual é um padrão amplamente aceito na literatura (Dolezel *et al.*, 2007). Amostras foram fragmentadas em 1 mL de tampão LB01 gelado, para a obtenção da suspensão nuclear. Esse homogeneizado foi filtrado em uma malha de náilon de $50\text{ }\mu\text{m}$ e corado com iodeto de propídeo (1 mg/mL), seguindo o protocolo de Dolezel *et al.*, (2007). A análise foi realizada em no mínimo três repetições, no citômetro de fluxo BD ACCURI C6, de acordo com as orientações do fabricante. O cálculo do valor 2C das amostras foi realizado seguindo a fórmula: Valor 2C da amostra = Valor 2C do padrão \times Média da posição do pico (fluorescência) da amostra, dividido pela média da posição do pico do padrão.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa Sisvar 5.6, por meio de um teste de análise de variância (ANOVA), considerando todos os valores do complemento monoploide por amostra, e também um teste de comparações de médias (Tukey-HSD), ambos com valor crítico de 5% (Ferreira, 2011, 2014). O teste de correlação de Pearson foi realizado no programa R ([/www.r-project.org](http://www.r-project.org)), e os gráficos elaborados com programa Gnumeric (Linux).

Análise genômica in silico

Os genomas de *Eleocharis elegans* e *E. geniculata* foram sequenciados em baixa cobertura por Illumina Miseq na Universidade da Georgia, USA. Os arquivos de saída R1.fastq e R2.fastq, foram filtrados usando as ferramentas do pacote FastXToolKit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/commandline.html), e convertidos em arquivos fasta para a montagem dos *assemblies* com o programa Velvet, todos em ambiente Linux. Os *assemblies* foram filtrados novamente para a retirada de *reads* menores de 150 pb, utilizando linhas de comando em linguagem GREP e SED, e salvos em formato fasta. Os dados foram contrastados contra referências depositadas em bancos de dados livres, como o RepBase

(<http://www.girinst.org/censor/>), GypsyDB (<http://gydb.org/index.php/MainPage>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esses *assemblies* também foram contrastados utilizando a ferramenta BLASTx local, contra o banco de dados All_ETs_DB.fasta, compilado de diferentes fontes, como rotina do LCDV, UEL.

As sequências que foram positivas para trechos proteicos conservados das famílias de DNAs repetitivos foram organizados em diferentes arquivos de acordo com a natureza da sequência, tais como Classes I e II, e outros, como destacado no Quadro S1. A organização das sequências foi baseada em arquivo tabular de saída do BLASTx (*E-value* 10e-4), com filtragem utilizando a linguagem SED, seguindo o agrupamento proposto por (Llorens et al., 2009). As linhagens de retrotransposons foram agrupadas em: *Copia* (Oryco, Retrofit, Sire e Tork) e *Gypsy* (CRM, Del, Reina, Galadriel, Athila e Tat). Para cada grupo de sequências, foram extraídas apenas aquelas com identidade acima de 60% e *E-value* 10e-4, com posterior checagem e correção da orientação das sequências usando comandos *revseq* e *seqret* em terminal Linux. A opção por uma identidade baixa justifica-se pela pobreza de sequências de espécies da ordem Cyperales anotadas e depositadas em bancos de dados livres. As sequências eleitas de acordo com a conservação da transcriptase reversa foram alinhadas com as ferramentas MUSCLE e ClustalW, e agrupadas em um gráfico de diversidade utilizando a ferramenta FigTree 1.3.1, todos em ambiente Linux. A busca por regiões conservadas da integrasse e RNase H seguiram o mesmo procedimento.

Desenho de primers

Para otimizar a produção de *primers*, foram considerados *scaffolds* relacionados a fragmentos conservados de todas as proteínas da cadeia poligênica, seguindo os mesmos critérios identidade e extensão relativa a cada linhagem das superfamílias *Copia* e *Gypsy*. As sequências de oligonucleotídeos foram desenhadas utilizando a ferramenta CustomPrimers - OligoPerfect™ Designer hospedada no site da Life Technologies (<http://tools.lifetechnologies.com>), para a amplificação de fragmentos entre 200 e 500 pares de bases. O Quadro 1 mostra os *primers*, indicando as linhagens, tamanho dos fragmentos esperados, domínios protéicos (INT, RT e RNaseH) e as sequências molde, onde EG corresponde a sequências de *Eleocharis geniculata* e EE de *Eleocharis elegans*.

Quadro 1. *Primers* desenhados que foram utilizados para amplificação por PCR.

Linhagens	<i>Primers</i>	Fragmentos (pb)	Domínios proteicos	<i>Scaffolds</i>
Oryco	F GCCGGGCCATTAGTATTTTC	410pb	INT	EG118
	R CGGCTCCTAGAACACCACA			
Sire	F CACTTGCCGAAGGTTTCTCT	350pb	RT	EG232
	R GAGACTCTTTAGGGTTTCGCTTG			
Tork	F CGATCCCATGAATCTGACTG	200pb	RT	EG1616
	R GACTCCAAGGCATGGCAAG			
Del	F GCTCAAGAGGCACTTCTGGT	250pb	INT	EE4221
	R ACGGCGTTGAAGTTCTTCTG			
CRM	F GAAGTAGAGTGCGACGCTTCA	250pb	RNaseH	EE1989
	R GTCGGCACTCAGCTTGT			
Athila	F TGGTAGCGGTGGATTATGTG	440pb	INT	EE338
	R GCCCAATATGCCTTATGCTC			
Tat	F CCTCCAGAAACCTGAAACA	200pb	RT	EE2869
	R AGCCAAAACCTGGTGGTTTGA			

Citogenética convencional

Raízes jovens foram coletadas e tratadas com o antimetabólico 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24h. As amostras foram fixadas em solução composta por metanol e ácido acético (3:1, v:v), mantidas sob agitação por até 12 horas e estocadas em *freezer* até o momento do uso. Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas em água destilada, digeridas em uma solução enzimática composta por celulase e pectinase (2:20, m:v), por 1h a 37 °C. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas em ácido clorídrico 1 M por 12 min a 60 °C, e as lâminas preparadas pelo método de esmagamento em uma gota de ácido acético 60%. As lâminas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido, e as lâminas secas ao ar. As amostras foram coradas com Giemsa 2%, adaptado de Guerra e Souza (2002), com posterior montagem permanente em Entellan para a observação em microscopia de luz, em campo claro.

Extração de DNA total e PCR

Colmos jovens foram macerados em nitrogênio líquido e tratados com tampão de extração CTAB (Romano *et al.*, 1999). As amostras foram purificadas com fenol:clorofórmio (1:1, v:v) e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v:v), centrifugadas, e o DNA precipitado em etanol absoluto. Após a eluição em TrisHCl pH 8, a concentração do DNA foi estimada em NanoDrop 2000.

Fragmentos das regiões proteicas conservadas de cada linhagem de retrotransposon foram amplificados utilizando *primers* específicos, tendo como molde DNA genômico de cada uma das sete espécies de *Eleocharis*. Para tal, foi utilizada uma PCR padrão, sendo o *mix* composto por: 0,5 µL de *Taq* Polimerase a 5 u/µL (Fermentas); 2,5 µL tampão 10 ×; 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM; 1 µL de dNTP a 10 mM, 2 µL de cada primer a 5 mM e H₂O para um volume final de 25 µL. As PCRs foram feitas em um termociclador PTC 100 BioRad, na seguinte condição: 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 59 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, finalizando com 72 °C por 10 min. As reações foram checadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, de 3 V/cm, e coradas com brometo de etídio.

Localização in situ

A FISH (*fluorescence in situ hybridization*) foi utilizada para verificar a posição física dos retrotransposons nos cromossomos das espécies de *Eleocharis*. As raízes coletadas e fixadas, como descrito anteriormente, foram digeridas em uma solução composta por celulase e pectinase (2:20, m:v) por 4h a 37 °C, e as lâminas preparadas em uma gota de ácido acético 60%, sem a hidrólise ácida. Após a retirada das lamínulas em nitrogênio líquido, as lâminas foram tratadas com 50 µL de uma solução de RNase a 10 mg/mL, a 37 °C por 1h e pepsina 10% (10 a 30 min em banho maria a 37 °C). Em seguida as lâminas foram desidratadas em série alcoólica e desnaturadas em formamida 70% a 70 °C por 10 minutos.

Para a FISH, foi adicionada à lâmina 34 µL de um *mix* contendo formamida deionizada 100 %, polietilenoglicol 50 %, SDS 10 %, 20× SSC, DNA de bloqueio (timo de bezerro) e 100 ng de sonda marcada. Os fragmentos de cada linhagem de retrotransposon gerados por PCR foram marcados também por PCR, utilizando um *mix* contendo um dos nucleotídeos conjugados com marcadores ou fluoróforos, sendo biotina-11-dUTP, digoxigenina-11-dUTP ou Cy3-dUTP.

O conjunto de lâminas e *mix* foi acondicionado em um termociclador (95 °C por 10 min, 50 °C por 10 min e 38 °C por 10 min) para a desnaturação e anelamento. A hibridização foi feita em câmara úmida em uma estufa a 37 °C por 24 horas. Os banhos pós-hibridização foram realizados em tampão SSC a uma estrigência de 50 %, dada a utilização de sondas heterólogas. Na detecção foram utilizadas avidina-FITC e anti-digoxigenina-rodamina em BSA 5% preparado em 4× SSC/0,2% Tween 20. Após as lavagens pós-deteção as lâminas foram montadas em um meio contendo 21 µL de antifade (DABCO), 4 µL de DAPI 4 µg/mL e 2 µL de cloreto de magnésio (25mM).

Obtenção das imagens

As imagens foram obtidas em microscópio de epifluorescência DM4500B acoplado com uma câmera DFC300FX, ambos Leica, e otimizadas para brilho e contraste com o programa GIMP 2.8 em ambiente Linux.

Resultados

Citometria de fluxo e citogenética convencional

A quantidade de DNA total medida em células somáticas ($2C$) obtida simultaneamente com um dos padrões (*Rhynchospora breviuscula*, *R. pubera* ou *Solanum lycopersicum*) e os valores são apresentados na Tabela 1. As Figuras 1A e B mostram os histogramas da citometria de fluxo, tendo como exemplos duas medições, em *E. maculosa* com o padrão *S. lycopersicum* (Fig. 1A) e em *E. geniculata* com um padrão da família Cyperaceae, *R. breviuscula* (B). As leituras, baseadas em contagens de mais de 30 mil núcleos/espécie, apresentaram coeficientes de variação (CV) < 5%. A variação na quantidade de DNA total foi de $0,86 \pm 0,04$ pg para *E. maculosa* ($2n = 2x = 6$) a $5,03 \pm 0,20$ pg para *E. niederleinii* ($2n = 8x = 42$). É importante ressaltar que cariótipo com $2n = 6$ foi derivado de simploidia e que com $2n = 42$ foi derivado de agmatoploidia, de acordo com o número básico $x = 5$. A análise comparativa do conteúdo de DNA nas espécies, levando em consideração os valores dos complementos monoploides (Cx), mostrou que *E. elegans* e *E. montana*, com diferentes níveis de ploidia ($2n = 4x = 20$ e $2n = 8x = 40$, respectivamente) tiveram um valor Cx médio de 0,58 pg, enquanto que *E. maculosa* ($2n = 2x = 10$) e *E. geniculata*, ambas com $2n = 2x = 10$, apresentaram $\sim 0,50$ pg. As amostras poliploides de *E. geniculata* com $2n = 4x = 20$ e *E. filiculmis* com $2n = 6x = 30$ tiveram valores médios intermediários, com 0,46 e 0,53 pg, respectivamente (Tabela 1).

Esses valores mostram que o aumento no conteúdo de DNA acompanha o aumento nos níveis de ploidia (correlação de Pearson com $R^2 = 0,712$, Figs. 1C e 2B). Contudo, nem todos os poliploides acumularam DNA de modo similar. *Eleocharis flavescens*, com $2n = 4x = 20$, apresentou o menor conteúdo Cx (0,41 pg) em comparação com *E. elegans*, também com $2n = 20$ e 0,58 pg / 2,34 pg (Tabela 1 e Fig. 2A). A análise de variância (ANOVA) mostrou que os valores em picogramas de Cx são significativamente diferentes ($p < 0,05$), e o teste de Tukey (HSD) para comparações de médias, indicado pelas letras minúsculas na

Tabela 1, separou as espécies em relação aos maiores e menores valores médios. Esse teste aproximou espécies filogeneticamente próximas no subgênero *Eleocharis*, como por exemplo *E. maculosa*, *E. geniculata* e *E. flavescens* (secção *Eleogenus*) e *E. montana* e *E. elegans* (secção *Eleocharis*), deixando mais separadas *E. filiculmis* e *E. niederleinii*.

De uma maneira geral, os valores médios obtidos pelo teste de Tukey para Cx corroborou com a estrutura dos cariótipos, assim como com dados de medidas cromossômicas já descritas na literatura para essas espécies. A análise dos nove cariótipos mostrou que os cromossomos não têm constrições primárias, sendo assim considerados holocêntricos (Fig. 3). Não houve grandes variações no tamanho dos cromossomos entre *E. geniculata* e *E. maculosa* com $2n = 10$ e $20/10^{\text{II}}$ (Figs. 3C, D e E), *E. flavescens* com $2n = 20$ (Fig. 2F) e *E. filiculmis* com $2n = 30$ (Fig. 3H). Contudo, os cromossomos de *E. elegans* com $2n = 20$ (Fig. 2G) são aparentemente maiores que os das demais espécies, o que concorda com os valores em picogramas obtidos na citometria de fluxo. Quando dividimos os valores 2C pelo número cromossômico, *E. elegans* mostra 0,12 pg/cromossomo, enquanto que *E. flavescens* apresenta 0,08 pg/cromossomo, sendo que ambas têm $2n = 4x = 20$. O cariótipo de *E. maculosa* com $2n = 6$, o qual foi originado por quebra e fusão, apresenta cromossomos com tamanhos variados (Figs. 3A e B), assim como os observados em *E. niederleinii* com $2n = 42$. Nesta última espécie, há quatro cromossomos com o dobro ou mais do tamanho dos menores (Fig. 3J), também decorrente de quebra e fusão. Isto torna evidente que também há diferenças intraespecíficas no tamanho dos cromossomos. *Eleocharis montana*, com $2n = 40$, também exibiu um cariótipo assimétrico com alguns cromossomos alcançando quase o dobro do tamanho dos menores, embora não haja evidências claras de rearranjos (Fig. 3I).

Tabela 1. Comparação de conteúdo de DNA de *Eleocharis* usando citometria de fluxo e análise cariotípica.

Espécies	2n	Núcleos	Mbp (2C)	pg±DP	pg (Cx)	HSD	Localidades
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem. e Schult.	2n = 2x = 6	40.487	841,11	0,86±0,04	0,43	a	S 25°20'39,28" / W 49°50'31,61"
	2n = 2x = 10	56.342	976,42	1,00±0,04	0,49	c	S 25° 25'58,21" / W 48°42'58,34"
<i>E. geniculata</i> (L.) Roem. e Schult.	2n = 2x = 10	45.661	985,55	1,01±0,03	0,50	c	S 25°20'39,28" / W 49°50'31,61"
	2n = 4x = 20	49.597	1.814,12	1,85±0,08	0,46	b	S 21°51'48" / W 50°32'16"
<i>E. flavescens</i> (Poir.) Urb.	2n = 4x = 20	50.048	1.608,46	1,64±0,07	0,41	a	S 23°18'32,4" / W 51°22'9,12"
<i>E. elegans</i> (Kunth)	2n = 4x = 20	34.609	2.285,19	2,34±0,11	0,58	e	S 19°34'37" / W 57°00'42"
<i>E. filiculmis</i> (Kunth)	2n = 6x = 30	97.343	3.105,15	3,18±0,05	0,53	d	S 22°03'38,8" / W 50° 35' 31,9"
<i>E. montana</i> (L.) Roem. e Schult.	2n = 8x = 40	72.090	4.584,27	4,69±0,09	0,58	e	S 23°54'48,11" / W 50° 34'36,90"
<i>E. niederleinii</i> Boeckeler	2n = 8x = 42	40.887	4.918,74	5,03±0,20	0,63	f	S 25°20'39,28" / W 49°50'31,61"
<i>R. breviscula</i> H. Pfeiff	2n = 10	> 30.000	782,40	0,80	-	-	S 24°35'07,36" / W 48°35'51,62"
<i>R. pubera</i> (Vahl) Boeckeler	2n = 10	> 30.000	3.217,62	3,29	-	-	S 8° 02'51,22" / W 34°52'37,07"
<i>S. lycopersicum</i> L. 'Stupické polní rané' (tomate)	2n = 24	> 30.000	1.916,88	1,96	-	-	*

2n = número cromossômico diploide; Núcleos = número de núcleos contados; Mbp (2C) = Valor C em células somáticas em mega pares de base e pictogramas (pg), onde DP = desvio padrão; HSD (*honestly significant difference*) = Teste de comparações de médias, as letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey 5% probabilidade. * Sementes cedidas por Jaroslav Dolezel - Department of Cell Biology and Genetics, Palacky University - Czech Republic.

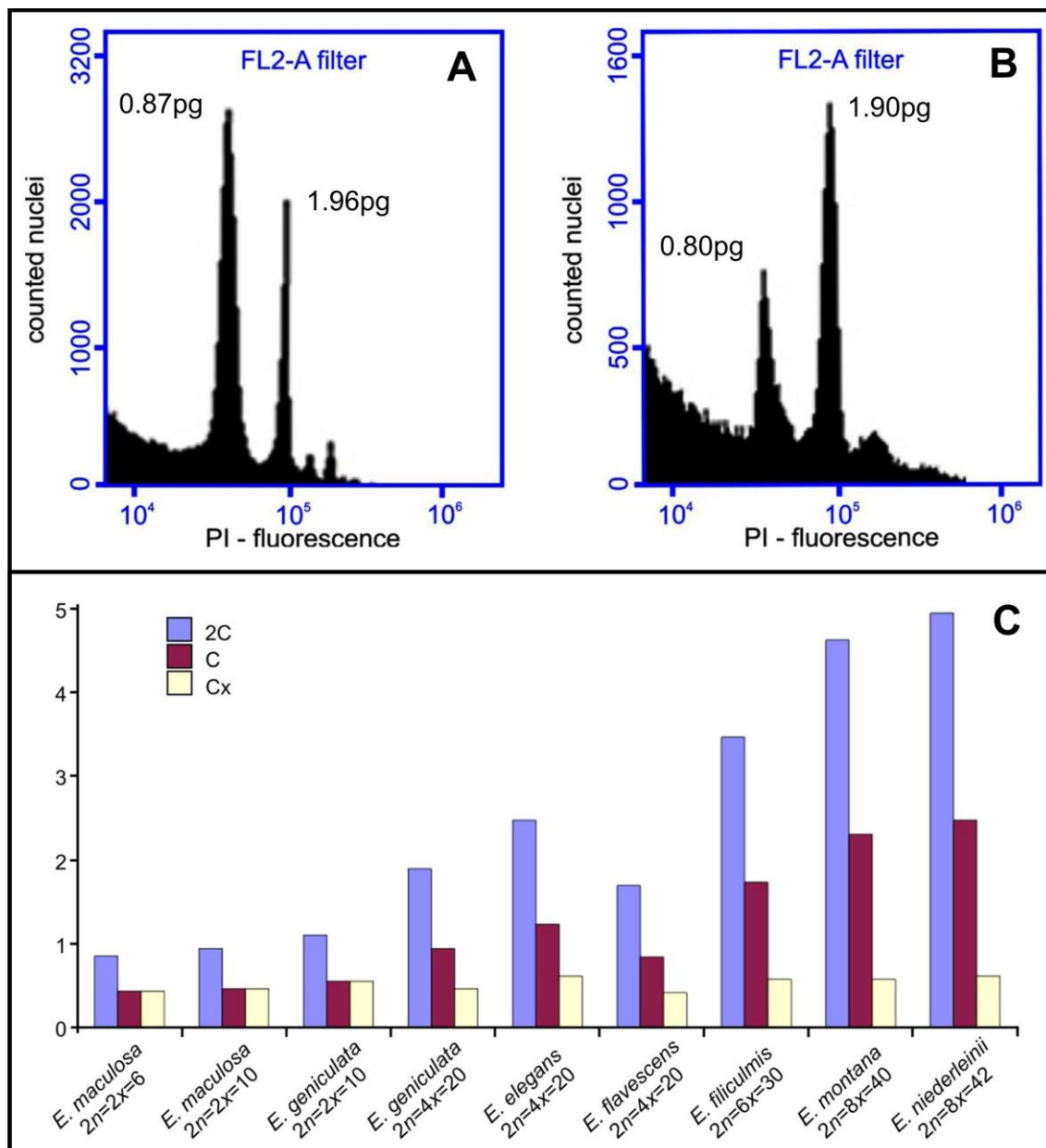


Figura 1: Citometria de fluxo e comparação do conteúdo de DNA. (A) Histograma mostrando o resultado de saída de uma leitura de citometria de fluxo em *E. maculosa* com o padrão *S. lycopersicum* ($2C = 9,73 \times 10^4$ de fluorescência). O pico da esquerda com 0,87 pg ($4,37 \times 10^4$ de fluorescência) representa o valor 2C em *E. maculosa* ($2n = 6$), enquanto que o pico da direita com 1,96 pg representa o valor 2C do padrão. (B) Histograma mostrando o valor de 1,90 pg ($9,0 \times 10^4$ de fluorescência) em *Eleocharis geniculata*, com o padrão *R. breviscula* com $2C = 0,80$ pg e fluorescência de $3,78 \times 10^4$. pg = picogramas, CV < 5%. (C) Comparação dos valores obtidos por citometria de fluxo para nove espécies de *Eleocharis*, com os valores de DNA total em células somáticas (2C), quantidade de DNA do complemento haploide (C) e quantidade de DNA do provável complemento monoploide (Cx), em picogramas. Note que o aumento no conteúdo de DNA acompanhou o aumento no nível de ploidia, exceto em *E. flavescens*, cujos valores ficaram abaixo do esperado.

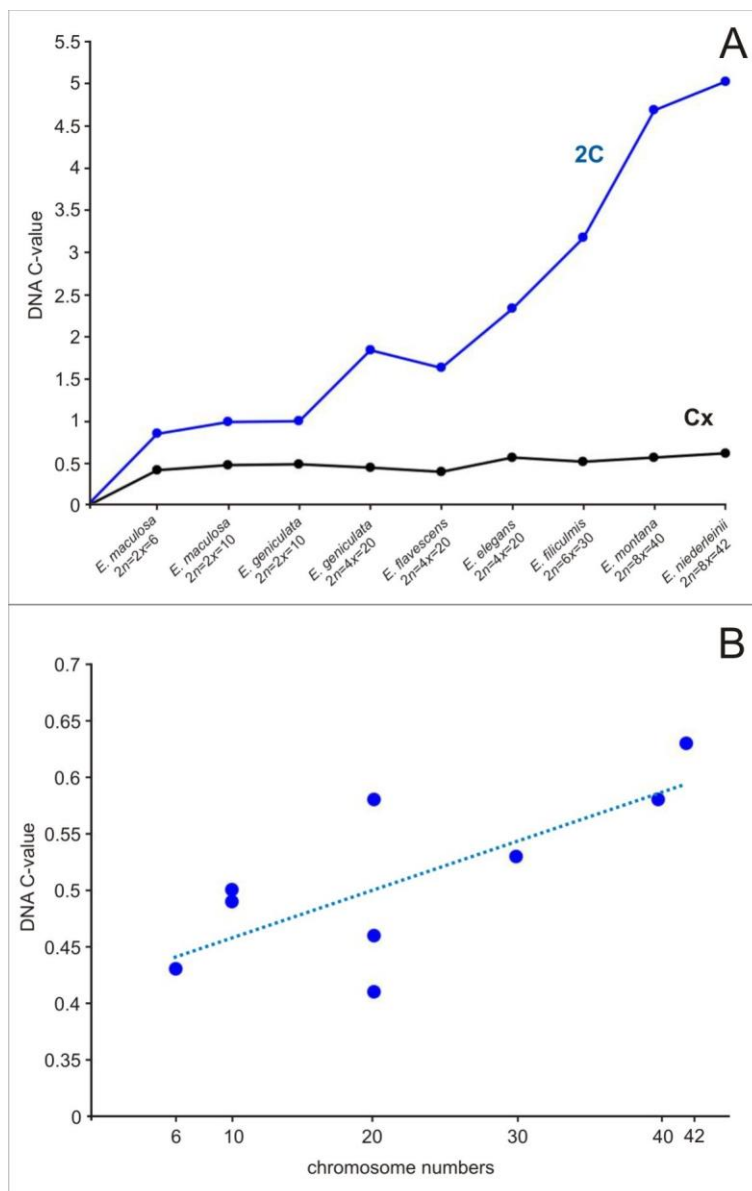


Figura 2. Correlação entre número cromossômico e a quantidade de DNA. **(A)** Comparação dos valores 2C (DNA total) e Cx (provável complemento monoploide), obtidos por citometria de fluxo para nove amostras de sete espécies de *Eleocharis*. Note que o aumento no conteúdo de DNA acompanhou o aumento no nível de ploidia, exceto em *E. flavescens*, cujos valores ficaram abaixo do esperado. **(B)** Correlação entre no número cromossômico e a quantidade de DNA, segundo complemento monoploide (Cx), onde $R^2 = 0,712$.

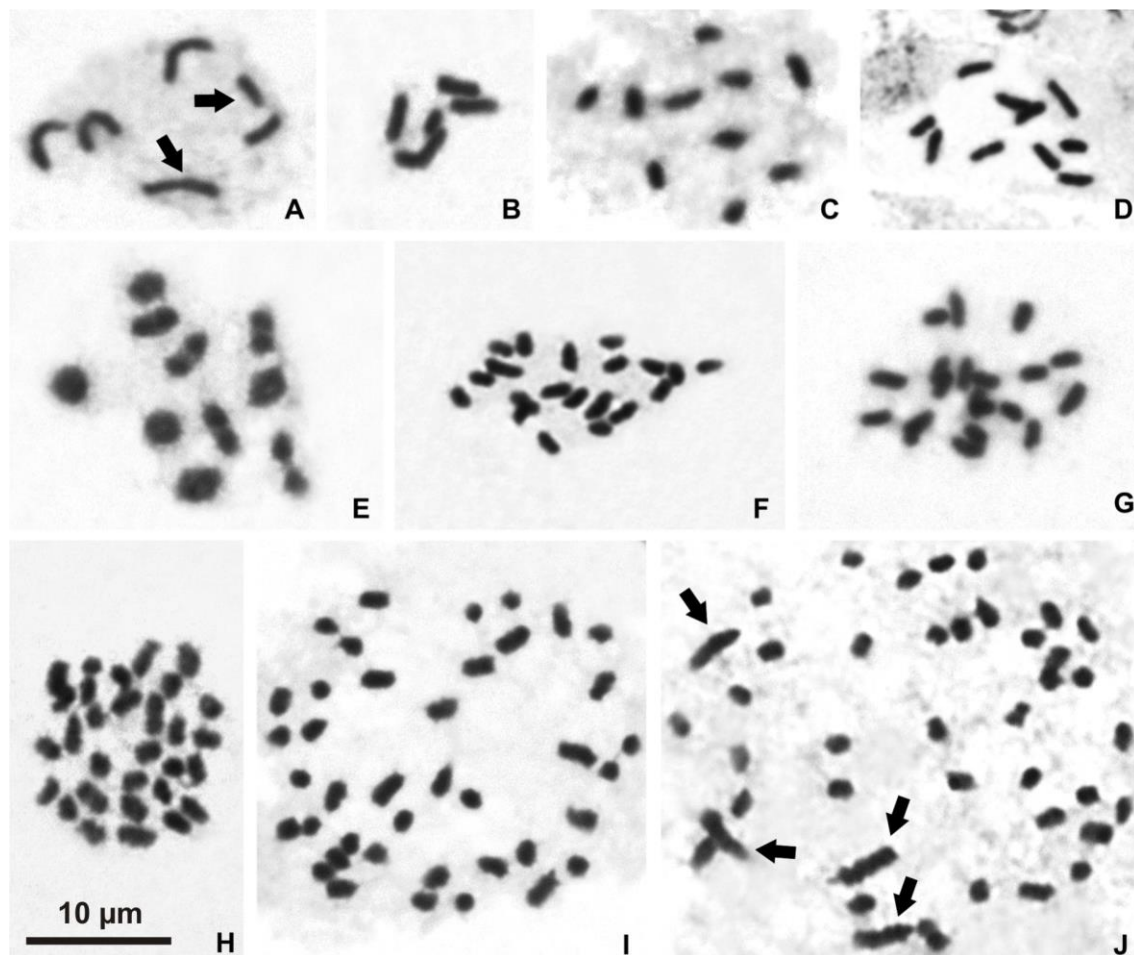


Figura 3: Cromossomos corados convencionalmente com Giemsa, mostrando variação no número cromossômico e a ausência de constrições primárias. (A) Prometáfase em *E. maculosa* com $2n = 6$. (B-D) Metáfases mitóticas em *E. maculosa* com $2n = 6$, *E. maculosa* com $2n = 10$, *E. geniculata* com $2n = 10$, respectivamente. (E) Metáfase meiótica em *E. geniculata* com $2n = 20$, observe a formação apenas de bivalentes. (F) Metáfases mitóticas em *E. elegans* com $2n = 20$ (G) Metáfase *E. flavescens* com $2n = 20$ (H) *E. filiculmis* com $2n = 30$, (I e J) *E. montana* com $2n = 40$ e *E. niederleinii* com $2n = 42$, respectivamente. As setas destacam as variações intracariotípicas, apontando os maiores e menores cromossomos, derivados de rearranjos. Barra = 10 μm .

Análise genômica comparativa

O sequenciamento em Illumina dos genomas de duas espécies de *Eleocharis* (*E. elegans* e *E. geniculata*), gerou arquivos de saída com milhões de sequências de 100 pb. Após a filtragem dos *reads*, obtivemos arquivos de saída contendo um número diferente de *reads* entre os dois genomas (Tabela 2). Após a montagem desses utilizando diferentes *K-mers*, 45 para *E. elegans* e 67 para *E. geniculata*, obtivemos arquivos de saída contendo milhares de *scaffolds*, mas com um número contrastante de sequências mapeadas, provavelmente decorrente da qualidade do sequenciamento. (Tabela 2).

Tabela 2. Dados da montagem dos *assemblies* em *E. geniculata* e *E. elegans*, usando o programa Velvet.

Espécie	Reads de entrada	K-mers Velvet	Número de scaffolds	Scaffolds mapeados
<i>E. elegans</i>	5.448.113	45	79533	9268
<i>E. geniculata</i>	1.177.302	67	9973	714

A busca por trechos de elementos de transposição utilizando como referência os bancos de dados local (All_TEs_DB.fasta) e de acesso livre (GyDB e RepBase), mostrou que apenas 11,62% e 7,16% dos *assemblies* foram mapeados nos genomas parciais de *E. elegans* e *E. geniculata*, respectivamente. Nessa busca reconhecemos uma predominância de elementos de transposição das Classes I e II (Quadro S1 e Fig. 4), sendo os retrotransposons os mais abundantes nos dois genomas, ocupando 76,87% das sequências mapeadas em *E. elegans*, e 72,85% em *E. geniculata*. Desses, 63,5% e 61,25% corresponderam a trechos de retrotransposons com LTR, respectivamente (Quadro 1, Fig. 4). Os transposons representaram a segunda classe mais abundante das sequências mapeadas, com 17,78% em *E. elegans* e 15,12% em *E. geniculata* (Quadro 1, Fig. 4). Frações menores como de Badnavirus e outros elementos não passaram de ~4%.

Quantitativamente, os retrotransposons das superfamílias *Copia* e *Gypsy* foram similares, ocupando ~30% dos *scaffolds*. Contudo, quando refinamos a busca para destacar as linhagens, observamos que em *Copia*, houve uma predominância de Sire (11,84%) e Retrofit (8,33%) em *E. elegans*, e de Sire (14,27%) e Tork (9,44%) em *E.*

geniculata. Para a superfamília *Gypsy*, predominaram as linhagens Tat/Athila, com 11,92% / 12,03% em *E. elegans* e 9,90% / 17,33% em *E. geniculata*, respectivamente (Quadro S1, Fig. 4). Outros elementos repetitivos ocuparam uma fração menor desses dois genomas (Quadro S1).

O alinhamento por Blastx local (*E-value* 10e-4) das sequências mapeadas de *E. elegans* e *E. geniculata*, contra o banco de dados “LTR_RT_s_DB.fasta”, contendo apenas sequências conservadas da transcriptase reversa (RT), permitiu reconhecer e selecionar aquelas sequências com identidade >80%, o que aumentou a credibilidade da busca de trechos proteicos conservados. O agrupamento gerado após o alinhamento com as ferramentas MUSCLE e ClustalW, incluindo sequências referência, permitiu a construção de gráficos de aproximação (Figs. 5 e 6), que mostraram agrupamentos de 118 *scaffolds* de *E. elegans* para todas as linhagens, exceto Galadriel. Esse agrupamento separou as superfamílias *Copia* com 41 sequências de *Gypsy* com 77 sequências. Dentre as linhagens de *Copia*, o clado Sirevirus (Oryco, Sire e Retrofit) foi o mais abundante com 30 sequências, enquanto a linhagem Tork mostrou apenas 11. A superfamília *Gypsy* teve 37 sequências do clado cromovírus amostradas (Reina, Del e CRM) e 39 do clado Athila/Tat (Fig. 5). Em *E. geniculata*, embora tenha havido uma redução de quase 13× no número de sequências mapeadas, foi possível a diferenciação das duas superfamílias. *Copia* teve 21 sequências e *Gypsy* 25, mas as linhagens não formaram grupos bem definidos, provavelmente devido ao número reduzido de sequências. Dentre os Sirevirus, as linhagens Oryco, Sire e Retrofit tiveram cerca de cinco sequências cada, e para Tork foram encontradas apenas três. Para a superfamília *Gypsy*, o clado Athila/Tat foi mais representado com 18 sequências, enquanto que o clado Cromovirus mostrou apenas três, não aparecendo as linhagens Reina e Galadriel. Essa distribuição pode ser vista na Figura 6.

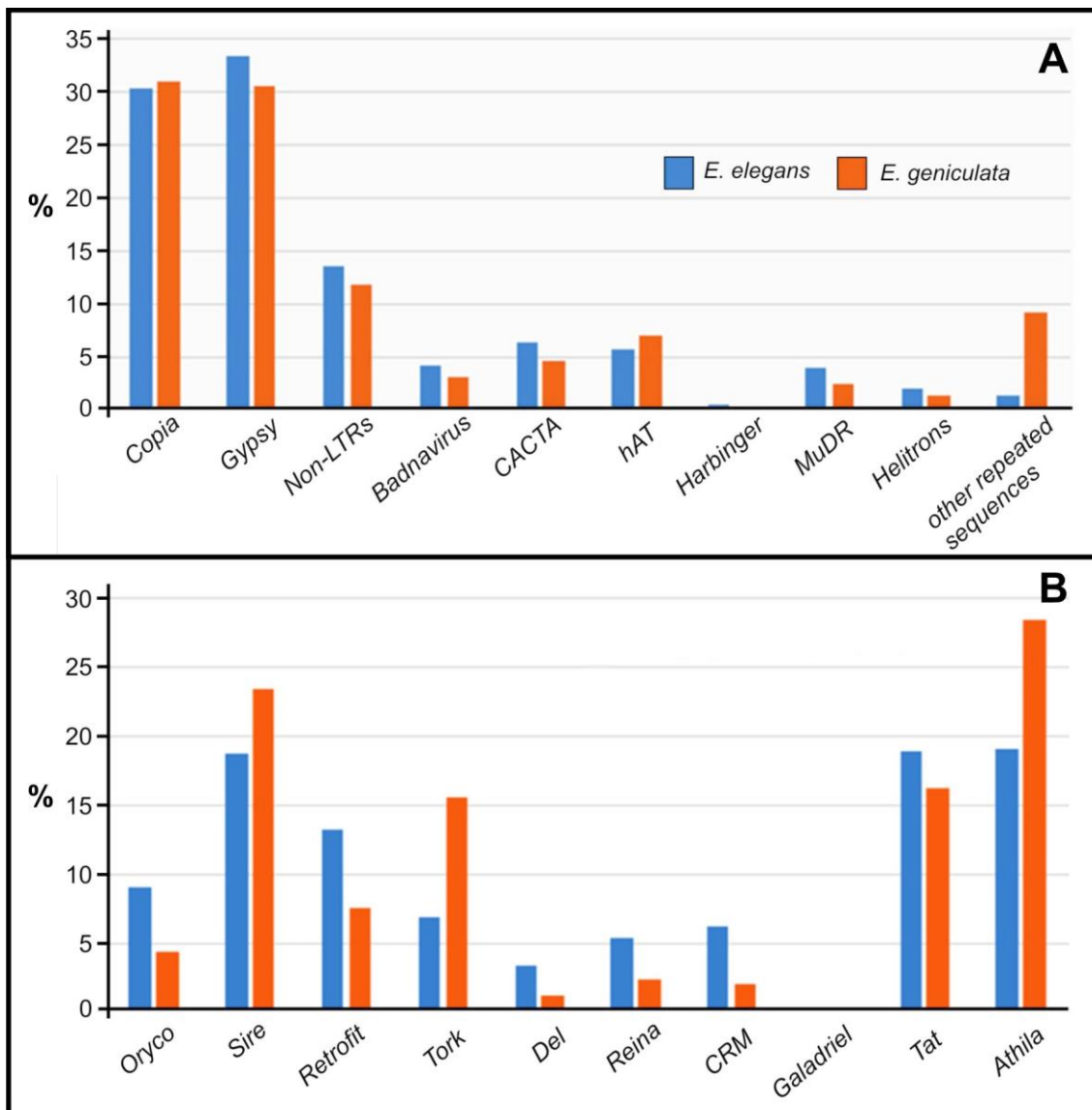


Figura 4. (A) Distribuição relativa (%) das classes de DNAs repetitivos nos genomas de *E. elegans* e *E. geniculata*. Note que os elementos de Classe I são predominantes em relação aos de Classe II. (B) Distribuição relativa (%) das superfamílias *Copia* e *Gypsy* nos genomas de *E. elegans* e *E. geniculata*. Observe que os clados Sirevirus de *Copia* e Tat/Athila de *Gypsy* predominam nos dois genomas.

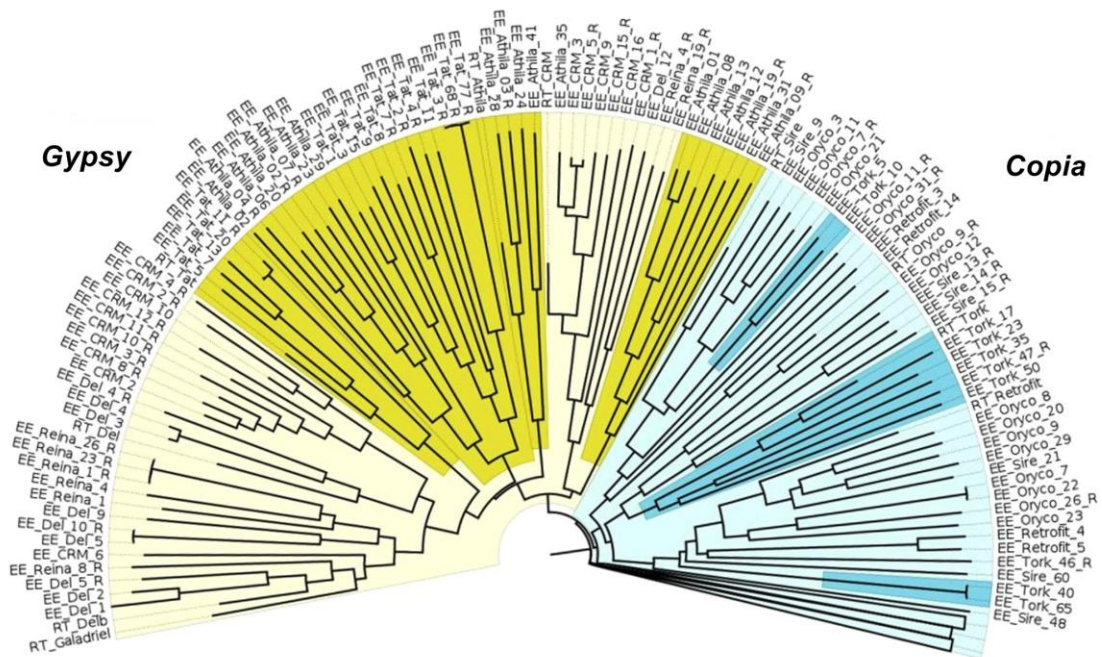


Figura 5. Gráfico de aproximação genética das regiões conservadas da transcriptase reversa de *E. elegans* (EE), juntamente com as referências de cada linhagem do GypsyDB. O clado Sirevirus (Oryco, Sire e Retrofit) da superfamília *Copia* aparece destacado em azul claro, e o clado Tork em azul escuro. As linhagens do clado Cromovirus (Del, Reina e CRM) de *Gypsy* estão representadas pela cor amarelo clara, e o clado Athila/Tat aparecem em amarelo escuro.

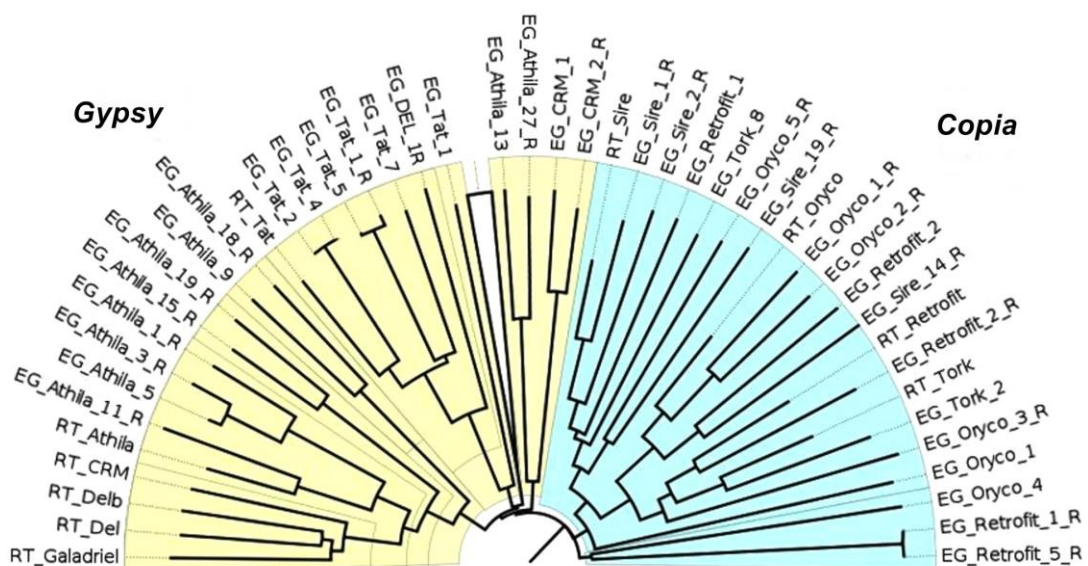


Figura 6. Gráfico de aproximação genética das regiões conservadas da transcriptase reversa de *E. geniculata* (EG), juntamente com as referências de cada linhagem do GypsyDB. O clado Sirevirus (Oryco, Sire e Retrofit) da superfamília *Copia* e o clado Tork, aparecem destacados em verde. As linhagens do clado Cromovirus (Del, Reina e CRM) e o clado Athila/Tat, de *Gypsy* aparecem em amarelo.

As sequências eleitas foram realinhadas para buscar os melhores trechos proteicos conservados para o desenho de *primers*. Os iniciadores foram testados por PCR contra os genomas de oito espécies do gênero *Eleocharis*, e os fragmentos gerados corresponderam exatamente ao tamanho previsto, tendo amplificado, de uma maneira geral, na maioria das espécies testadas. Exemplos dessas amplificações são apresentados na Figura suplementar S1.

Hibridização in situ

A FISH seguiu sempre com sondas das linhagens de *Copia* marcadas com biotina e detectadas com avidina-FITC (verde), e de *Gypsy* marcadas com digoxigenina e detectadas com anti-digoxigenina-rodamina (vermelho) ou marcadas diretamente com Cy3-dUTP. Para a superfamília *Copia*, foram produzidas sondas apenas para as linhagens Oryco e Sire. As hibridizações usando como sonda a linhagem Oryco mostraram que em todos os cariótipos alguns cromossomos acumularam mais sinais do que em outros. Em *E. maculosa* (Figs. 7A-E), por exemplo, há sinais dispersos e em blocos mais acumulados em quatro cromossomos. Em *E. elegans* (Figs. 7F-H) e *E. montana* (Figs. 7I-K) apareceram mais sinais dispersos do que em blocos, contudo, esses sinais foram evidentes em quase a metade dos cromossomos em ambas as espécies. Em *E. niederleinii* (Figs. 7L-N), de outro modo, além dos sinais dispersos, foram observados blocos intersticiais na forma de *dots* em alguns cromossomos, e terminais associados à heterocromatina.

A hibridização com a sonda Sire, outra linhagem de *Copia* mostrou que em três espécies de *Eleocharis* há um perfil de sinais predominantemente disperso. Para *E. elegans*, além dos sinais foram dispersos nos cromossomos, pequenos *dots* foram visíveis em dois cromossomos (Figs. 8A e B). Em *E. montana* a sonda hibridizou em metade dos cromossomos (Figs. 8C e D) assim como em *E. niederleinii*, mas nesta espécie, os sinais apareceram fortemente dispersos nos quatro cromossomos maiores, e mais fracos nos cromossomos menores (Figs. 8E-G).

Para a superfamília *Gypsy* foram produzidas sondas das linhagens Del, CRM e Athila/Tat. A sonda CRM hibridizou de maneira tanto dispersa quanto em blocos, mas com grande diferença na ocorrência intra- e intercariotípicas. Em *E. maculosa*, dois cromossomos exibiram sinais fortes, com uma distribuição contínua ao longo dos cromossomos, exceto nas extremidades (Figs. 9D, d1 e d2). Nos demais cromossomos, os sinais apareceram dispersos, e em quatro cromossomos foram observados *dots* (Figs. 9A-D). *Eleocharis elegans* apresentou sinais de hibridização dispersos com alguns poucos *dots* intersticiais de difícil identificação. Contudo, em quatro cromossomos os sinais da FISH foram pouco evidentes, sugerindo uma baixa concentração dessa linhagem em parte dos cromossomos (Figs. 9E-G). As espécies com maior nível de ploidia mostraram uma concentração de sinais de hibridização apenas em parte dos cromossomos. Para *E. montana*, essa sonda hibridizou mais fortemente em metade deles de maneira dispersa, porém, ainda foi possível observar pequenos *dots* em alguns desses. Nos demais cromossomos, os sinais foram bem mais fracos e dispersos (Figs. 9H-J). Em *E. niederleinii*, os sinais apareceram de modo disperso e mais intensos nos quatro maiores que foram derivados de rearranjos, e também em outros seis menores. Os demais cromossomos apresentaram poucos sinais dispersos ou até mesmo nenhum sinal perceptível hibridização (Figs. 9K-M).

A linhagem Del, também da superfamília *Gypsy*, mostrou um perfil geral de hibridização similar ao que foi visto em CRM, e a quantidade de sinais dispersos e em blocos também variou entre as espécies. Em *E. maculosa*, os sinais apareceram como *dots* diminutos ao longo dos cromossomos, sem acúmulo diferencial entre eles (Figs. 10A e C), diferentemente da hibridização com a sonda CRM. Em *E. elegans* os sinais apareceram dispersos e em *dots*, de maneira mais evidente do que os sinais

observados com a sonda CRM. Apenas em quatro cromossomos esses sinais de Del foram bem fracos (Figs. 10D-F). Em *E. montana*, metade dos cromossomos acumulou mais sinais dispersos do que em *dots*, enquanto que nos demais, os sinais da FISH foram finamente dispersos (Figs 10G-I). Este mesmo perfil de hibridização foi visto com a sonda CRM. *Eleocharis nierderleinii* assim como em *E. montana*, mostrou alguns cromossomos com mais sinais de hibridização em relação aos demais, predominando nos quatro maiores, e em alguns cromossomos pequenos e de tamanho intermediário. É importante mencionar que nas regiões terminais ricas em heterocromatina, não houve colocalização de elementos CRM e Del (Figs 10J-L).

As sondas do clado Athila/Tat, diferentemente das demais linhagens, exibiram sinais de hibridização predominantemente em blocos. Em *E. elegans* os sinais de FISH apareceram em pequenos blocos, sendo que em dois cromossomos foi visível a presença de *dots* nas extremidades (Figs. 11A-C). Em *E. flavescens* a FISH mostrou sinais de hibridização em sua maioria formando blocos intersticiais evidentes (Figs. 11D-F), diferente daqueles sinais vistos com as sondas das linhagens CRM e Del. *Eleocharis montana* exibiu um número bem maior de blocos e *dots* distribuídos em todo o cariótipo (Figs. 11G-I), e não na metade desses como visto com as sondas CRM e Del. Em geral esses sinais fracos e fortes se intercalaram ao longo de alguns cromossomos, mas foi possível diferenciar os sinais tipicamente terminais daqueles intersticiais. Em *E. nierderleinii*, a sonda Athila/Tat mostrou sinais fracos e predominantemente dispersos, exceto por dois dos cromossomos que acumularam sinais ao longo de quase toda sua extensão (Figs. 11J-L). Em pelo menos um desses foi possível observar uma distribuição contínua dos sinais ao longo das cromátides, enquanto que no outro não. Vale a pena chamar a atenção para esta sonda, pois ela marcou apenas dois dos cromossomos grandes, enquanto que as demais sondas de *Gypsy* (CRM e Del) hibridizaram nos quatro. Além disso, não houve colocalização com as regiões terminais ricas em heterocromatina.

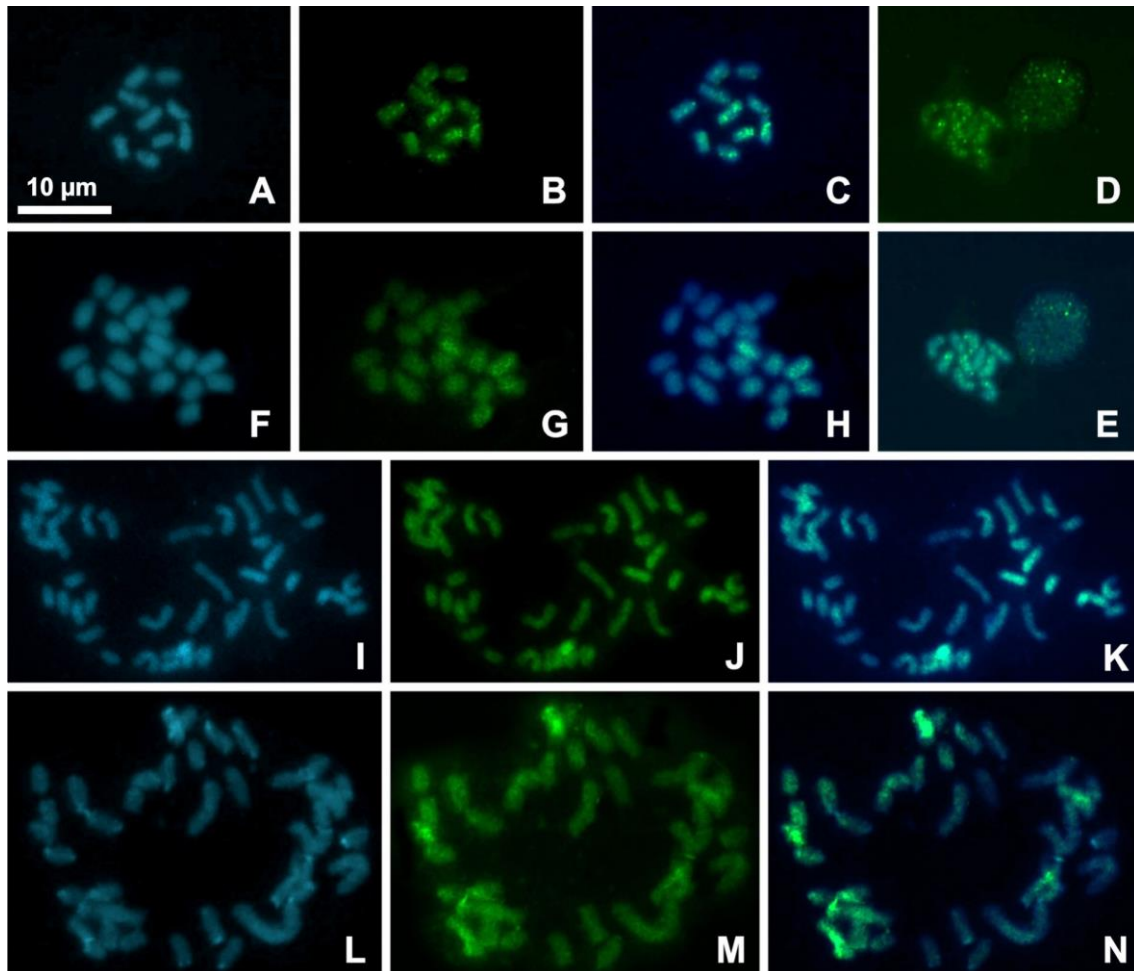


Figura 7. Hibridização *in situ* fluorescente com metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de INT-Oryco detectada com avidina-FITC (verde), em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-E)** *E. maculosa* com $2n = 10$ com sinais dispersos e a formação de pequenos blocos em pelo menos quatro cromossomos, evidenciando também os sinais no núcleo. **(F – H)** *E. elegans* com $2n = 20$, **(I-K)** *E. montana* $2n = 40$ e **(L-N)** *E. niederleinii* $2n = 42$. Observe que essas espécies essas sondas produziram mais sinais dispersos do que em *dots*. Barra = 10µm.

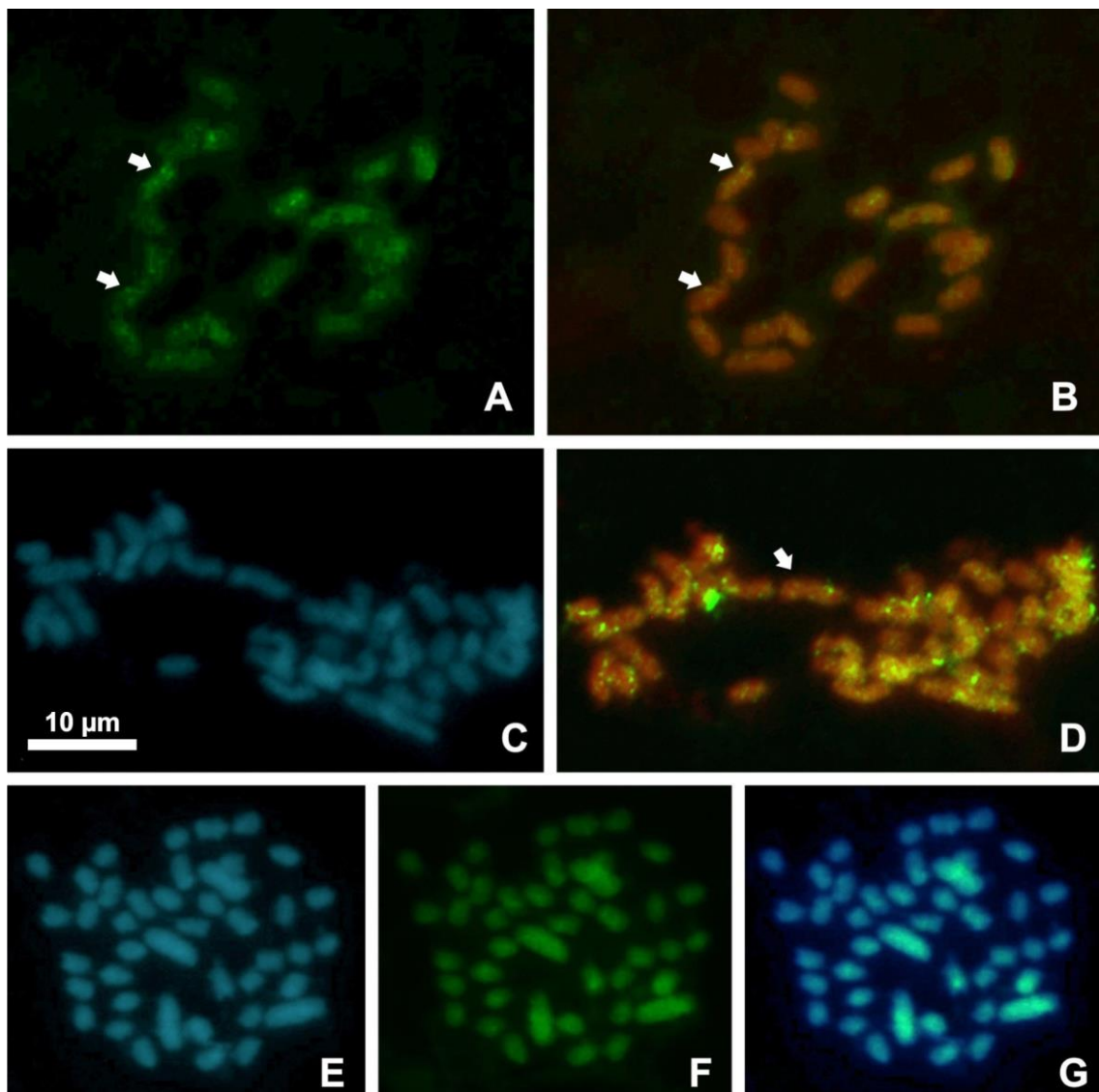


Figura 8. Hibridização *in situ* fluorescente com metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de RT-Sire detectada com avidina-FITC (verde), em três espécies de *Eleocharis*. A FISH produziu sinais principalmente dispersos. **(A e B)** *E. elegans* com $2n = 20$, com sinais dispersos e pequenos *dots* em dois cromossomos (setas). **(C e D)** *E. montana* $2n = 40$, mostrando sinais mais intensos e dispersos em metade dos cromossomos, mas também com *dots* (seta). **(E-G)** *E. niederleinii* com $2n = 42$, e sinais mais acúmulos nos quatro cromossomos maiores, e sinais mais finos em dispersos nos demais cromossomos. Barra = 10µm.

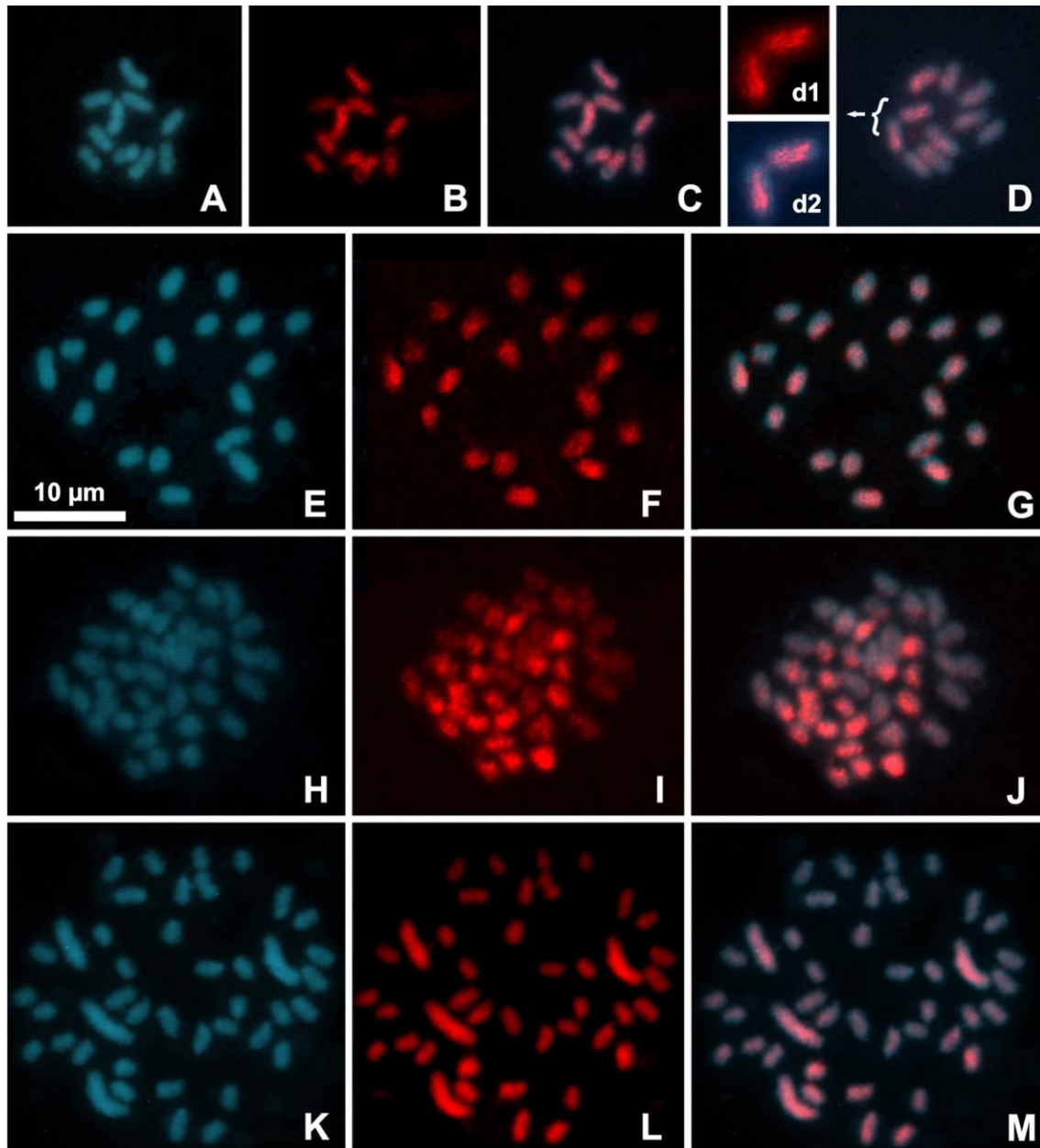


Figura 9. Hibridização *in situ* fluorescente, metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de RNaseH-CRM detectada com Cy3-dUTP (vermelho), em quatro espécies de *Eleocharis*. (A-D) *E. maculosa* com $2n = 10$, destaca dois cromossomos com sinais dispersos ao longo das cromátides exceto nas extremidades, e sinais dispersos nos demais. (E-G) *E. elegans* com $2n = 20$ com sinais dispersos (H-J) *E. montana* $2n = 40$ mostrando 22 cromossomos com sinais dispersos e de brilho intenso, e outros com sinais fracos ou ausentes. (K-M) Em *E. niederleinii* $2n = 42$, os sinais foram dispersos e mais intensos nos quatro cromossomos maiores e em seis cromossomos menores. Note que os demais apresentam sinais dispersos e mais fracos. Barra = 10µm.

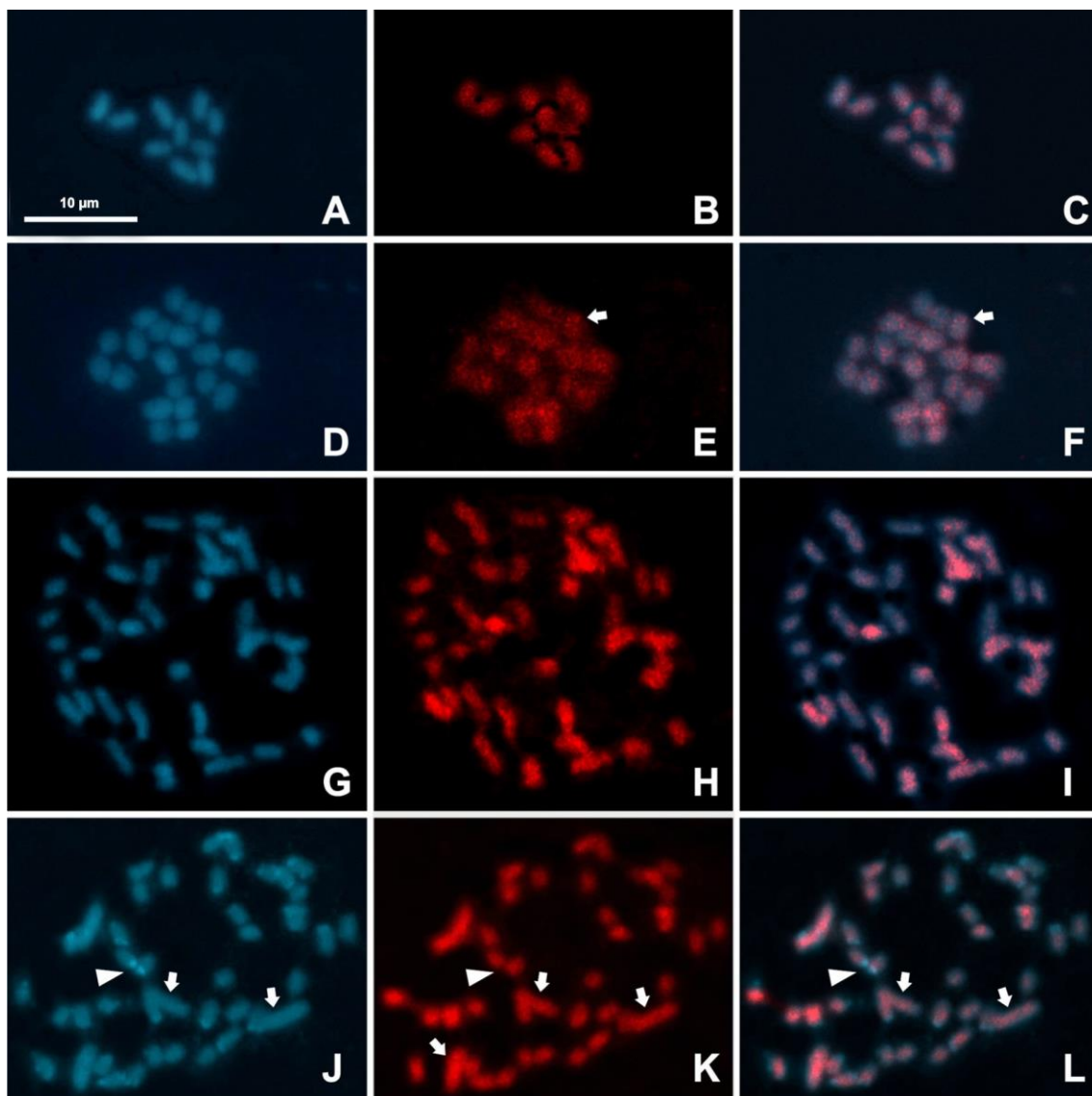


Figura 10. Hibridização *in situ* fluorescente em metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sonda de INT-DEL detectada com antidig-rodamina e Cy3-dUTP (vermelho), em quatro espécies de *Eleocharis*. **(A-C)** *Eleocharis maculosa* com $2n = 10$, com sinais dispersos em todos os cromossomos. **(D-F)** *E. elegans* com $2n = 20$ sinais dispersos e com *dots* em dois cromossomos **(G-I)** Em *E. montana* com $2n = 40$ pelo menos doze cromossomos mostraram sinais dispersos mais intensos e os demais sinais mais fracos. **(J-L)** Em *E. niederleinii* ($2n = 42$) os sinais aparecem mais acumulados nos quatro maiores, e em dois desses os sinais foram mais fracos (setas), além de sinais intensos em outros quatro menores. Pontas de seta indicam regiões de heterocromatina constitutiva sem sinais de hibridização. Barra = 10µm.

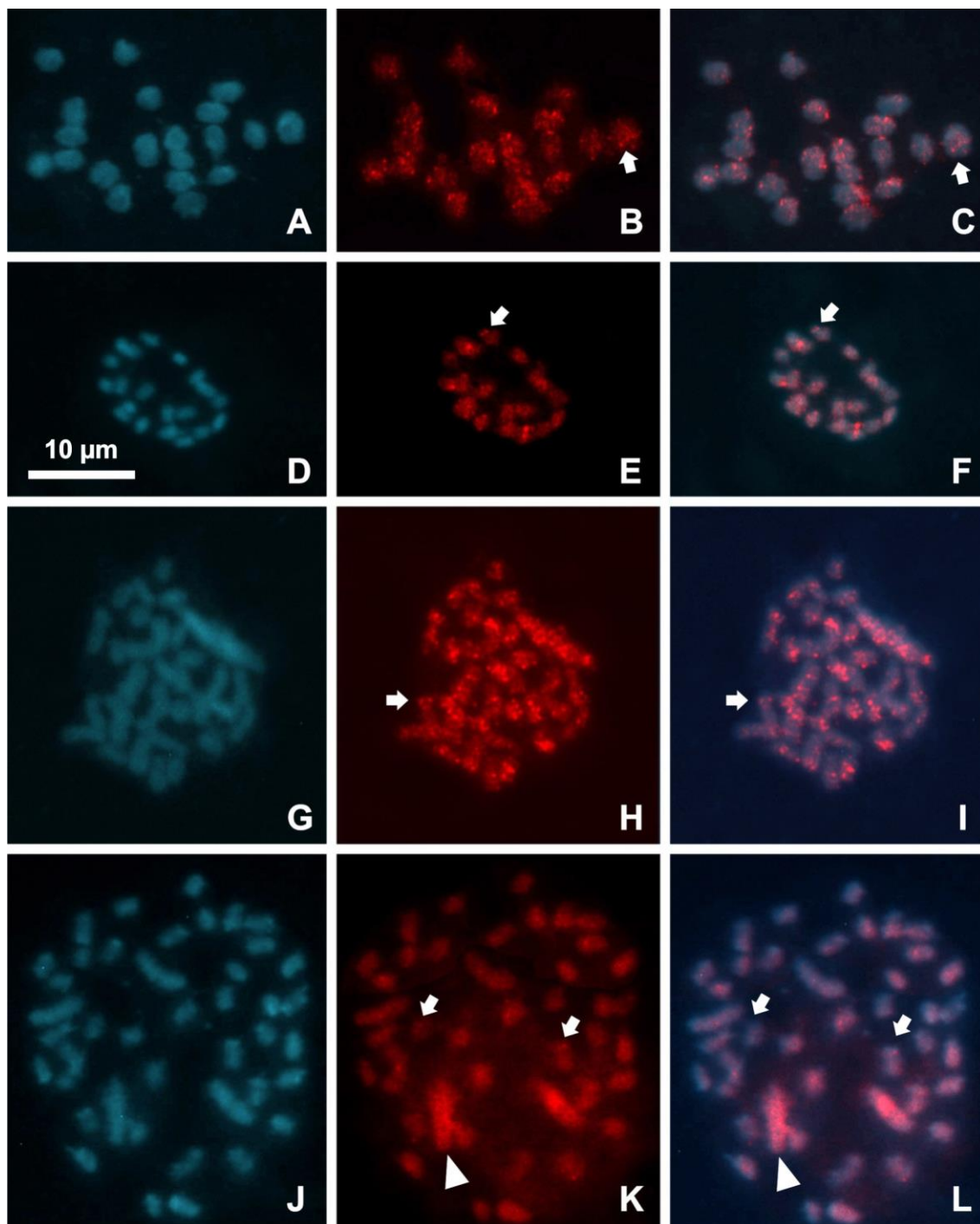


Figura 11. Hibridização *in situ* fluorescente em metáfases e prometáfases coradas com DAPI (azul), sondas de INT-Athila e RT-Tat foram marcadas com Cy3-dUTP (vermelho), e hibridizadas conjuntamente em quatro espécies de *Eleocharis*. (A-C) *Eleocharis elegans* com $2n = 20$, com sinais em blocos em todos os cromossomos e pequenos *dots*. (D-F) *E. flavescens* $2n = 20$, com sinais em blocos intersticiais em sua maioria, e com *dots* terminais. (G-I) Em *E. montana* ($2n = 40$) aparece um grande número de sinais em blocos em todos os cromossomos ao contrário de *E. niederleinii* $2n = 42$ (J-L) onde sinais fracos e dispersos foram observados, exceto pelos cromossomos maiores que possuem sinais fortes ao longo de toda extensão (pontas de seta). As setas apontam para *dots* terminais. Barra = $10\mu\text{m}$.

Discussão

Diferenciação cariotípica e do conteúdo de DNA

A literatura sugere que as variações no conteúdo de DNA em plantas tendem a acontecer devido a rearranjos cromossômicos numéricos, como a poliploidia, bem como estruturais, como deleções, ampliações, crossing-over desigual, recombinação não homóloga e ilegítima, envolvendo DNAs repetitivos (Grover e Wendel, 2010; Bennetzen e Wang, 2014). A diferença no conteúdo de DNA em plantas alcança mais de 200 vezes, de 63 Mpb em *Genlisea aurea* a 14.900 Mpb em *Paris japonica* (Bennett e Leitch, 2011). Acredita-se que a maior parte dessa variação seja devido a ação da poliploidia e do acúmulo/eliminação de elementos de transposição (Bennetzen, 2000; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011; Tenaillon *et al.*, 2011).

A maior parte dos exemplos dessa variação vem de estudos em grupos vegetais com cromossomos monocêntricos. Yan *et al.* (2016), por exemplo, analisaram o valor C de DNA em espécies diploides e poliploides de *Avena*, e observaram que os poliploides tiveram quase o dobro do valor C diploide, porém, com uma diminuição no conteúdo de DNA por eliminação de sequências repetidas. Há exemplos anteriores na literatura que demonstram que existe uma correlação positiva entre o tamanho dos genomas e o aumento de determinadas linhagens de retrotransposons, como o acúmulo de BARE-1 da superfamília *Copia* em 28 espécies diploides e poliploides de *Hordeum* (Vicent *et al.*, 1999).

O estudo da variação do conteúdo de DNA em plantas com cromossomos holocêntricos é especialmente interessante porque este tipo cromossômico tolera e perpetua mais rearranjos, quando comparado aos monocêntricos. Neste caso, os rearranjos cromossômicos podem desestabilizar os genomas, levando a estresses e atividade diferencial de elementos de transposição, o que poderia provocar flutuações nos conteúdos de DNA (Bures e Zedek, 2014). No entanto, informações sobre a variação do valor C de DNA em plantas holocêntricas são escassas, e tais inferências ainda não são possíveis. A variação na quantidade de DNA em *Eleocharis* observada aqui foi de 0,86 pg a 5,03 pg. Essa diferença de quase seis vezes acompanhou de maneira proporcional o aumento nos níveis de ploidia ($R^2 = 0,712$), que foi de $2n = 2x = 6$ a $2n = 8x = 42$, levando em consideração o número básico $x = 5$ descrito para o gênero

(Da Silva *et al.*, 2005). Em um estudo sobre o mesmo gênero, Zedek *et al.* (2010) descreveram uma variação de 0,84 pg em *E. cellulosa* a 18 pg em *E. sternerii*, ou seja, cerca de 21×. Esses autores estabeleceram uma forte correlação positiva ($R^2 = 0,918$) entre a quantidade de DNA e o número cromossômico em espécies européias deste gênero, reforçando o papel da poliploidia como o principal mecanismo responsável pela variação no valor C genômica em *Eleocharis*. Embora nossos resultados em espécies sulamericanas sejam igualmente importantes, porque confirmam a tendência evolutiva sugerida por estudos de citogenética e de citometria de fluxo (Da Silva *et al.*, 2008, 2010a; Zedek *et al.*, 2010), notamos uma pequena variação decorrente de outros eventos.

Quando comparamos o valor dos complementos monoploides (Cx) com os níveis de ploidia, pudemos perceber algumas flutuações no conteúdo de DNA dos poliploides. Em *E. flavescens*, com $2n = 4x = 20$, tanto os valores de Cx (0,41 pg) quanto os de 2C (1,64 pg) foram menores do que os valores de *E. elegans* com o mesmo nível de ploidia (0,58 e 2,34 pg, respectivamente). Neste caso, a variação de 30% nos tamanhos desses genomas concorda com a diferença de tamanho em micrômetros descrito por Da Silva *et al.* (2008, 2010a), os quais já haviam mostrado que os cromossomos de *E. flavescens* aparecem menores do que os de *E. elegans*. Provavelmente tais alterações envolvam diferenças na fração de DNA repetitivo.

De uma maneira geral, os poliploides apresentaram valores Cx maiores do que os diploides. Entretanto, vale a pena ressaltar que o maior valor Cx (0,63 pg) foi observado em *E. niederleinii* com $2n = 8x = 42$, e que essa espécie, além de apresentar 22 cromossomos com heterocromatina terminal, tem um cariótipo derivado de disploidia (quebra e fusão), com quatro cromossomos bem maiores que os demais (Da Silva *et al.*, 2016). Essas características cariotípicas podem influenciar positivamente na expressão de elementos de transposição, de modo a contribuir com o aumento no valor C observado nessa espécie em relação às demais analisadas. No entanto, *E. maculosa* com $2n = 2x = 6$, também derivado de disploidia (fusão), exibiu um valor Cx menor (0,43 pg), não seguindo a mesma tendência observada em *E. niederleinii*. Em *Carex*, um outro gênero de Cyperaceae, as espécies diploides com números cromossômicos variados, derivadas de disploidia, não mostraram diferenças significativas na quantidade de DNA (Chung *et al.*, 2011, 2012). Isto sugere que não há uma única tendência evolutiva em Cyperaceae, no sentido de haver aumento no conteúdo de DNA sempre que há cariótipos disploides. De acordo com Roalson *et al.* (2008), o aumento no

número cromossômico em *Carex* não está relacionado com o aumento na quantidade de DNA, mas sim com as quebras cromossômicas. Em *Luzula* (Juncaceae), uma outra família com cromossomos holocêntricos, Bozek *et al.* (2012) mostraram que não há uma correlação clara entre o aumento do número cromossômico com o aumento no tamanho dos genomas, isto porque em muitas das espécies, os números elevados são derivados de eventos de disploidia e não de poliploidia, como seria o esperado, considerando que ~70% das plantas é poliploide (Masterson, 1994; Chen, 2010).

Análise citogenômica comparativa

Existem atualmente dezenas de genomas vegetais sequenciados e anotados, e que podem servir como fonte de referência para contrastar com genomas parcialmente sequenciados. Em monocotiledôneas, por exemplo, alguns dos genomas melhor anotados são de sorgum, milho, arroz, braquipódio e abacaxi (Matsumoto *et al.*, 2005; Paterson *et al.*, 2009; Schnable *et al.*, 2009; Vogel *et al.*, 2010; Ming *et al.*, 2015). Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciamento de DNA ampliaram nosso entendimento sobre a composição e a diferenciação de genomas de espécies nativas por simples alinhamento com sequências referência. Neste sentido, esta estratégia foi usada para comparar dois genomas parcialmente sequenciados de *Eleocharis* (*E. elegans* e *E. geniculata*), quanto à ocorrência de frações conservadas de DNA repetitivo, especialmente dos elementos de transposição. Em nossa busca, verificamos que os transposons foram 17,78% para *E. elegans* e 15,12% para *E. geniculata*, e que os retrotransposons foram os mais abundantes nos genomas dessas espécies, com mais de 70% das sequências mapeadas. Esses dados concordam com aqueles revisados de Bennetzen e Wang (2014), os quais apontaram os retrotransposons como os elementos repetitivos predominantes nos genomas das plantas. Dos retrotransposons mapeados nessas duas espécies, 63,5% em *E. elegans* e 61,2% em *E. geniculata* foram trechos de elementos com LTR. Esses dados acompanham a alta porcentagem de LTR-RTs observada em milho (75,9%) e algodão com 88, 11% (Schnable *et al.*, 2009, Devos, 2010, Liu *et al.*, 2016).

Não houve diferenças contrastantes na quantidade de sequências entre as superfamílias *Copia* e *Gypsy* (~30% cada), nos *assemblies* mapeados de *E. elegans* e *E. geniculata*. No entanto, dados de outros genomas têm mostrado diferenças mais acentuadas na proporção dessas duas superfamílias, como por exemplo em *Musa*

acuminata, onde foram anotados 25,7% de *Copia* e 11,6% de *Gypsy* (D'Hont *et al.*, 2012) e em *Oryza sativa*, com 3,8% de *Copia* e 10,9% de *Gypsy* (Matsumoto, 2005). Um caso bem contrastante foi descrito em *Gossypium* onde foram mapeadas 91% de *Gypsy*, e com uma representatividade muito baixa de *Copia* (Liu *et al.*, 2016). De acordo Heslop-Harrison e Schwarzacher (2011), os genomas das plantas podem acumular diferenças quantitativas e qualitativas na fração de DNAs repetitivos, a depender da natureza das sequências, como por exemplo nas frações de SSRs, DNAsat, ETs. Algo similar foi percebido na comparação de *Copia* e *Gypsy* entre os genomas de *E. elegans* e *E. geniculata*, onde, embora tenha havido uma predominância de sequências de Athila/Tat de *Gypsy* e Sire de *Copia*, todas as linhagens variaram em quantidade entre si e entre os dois genomas. Isso sugere que, apesar de todos os retrotransposons possuírem o mesmo mecanismo de transposição, eles parecem apresentar independência quanto ao funcionamento e modo de distribuição genômica.

Os sequenciamentos de baixa cobertura trazem uma dificuldade em obter sequências completas, impossibilitando comparações mais amplas e consistentes, sobretudo em elementos de tamanho elevado, como os retrotransposons que variam de de ~4Kb a ~20 Kb, como consta no Gypsy Database 2.0 (<http://gydb.org>). Contudo, ainda assim é possível estudar a diversidade desses ETs usando seus domínios proteicos, já que esses são mantidos conservados porque são essenciais para o mecanismo de transposição. Há evidências de que a depender do grupo vegetal, pode haver mais heterogeneidade nas frações conservadas entre linhagens de retrotransposons, e em outros grupos maior homogeneidade (Galasso *et al.*, 1997). Para *Eleocharis*, foi possível separar sequências com boa identidade às proteínas da cadeia poligênica, de acordo com as linhagens de *Copia* (Oryco, Sire, Retrofit e Tork) e *Gypsy* (Del, CRM, Athila e Tat), o que possibilitou também analisar a frequência de cada linhagem nesses genomas. A transcriptase reversa apresenta um domínio amplamente conservado que, embora seja utilizado com mais frequência em estudos filogenéticos (Langdon *et al.*, 2000; Dixit *et al.*, 2006), nos permitiu agrupar de maneira consistente membros de *Copia* e *Gypsy*, por meio de gráficos de aproximação. Isso permitiu ainda assegurar que as escolhas das linhagens foram compatíveis com cada uma das superfamílias. Essa abordagem já foi aplicada com sucesso em estudos de linhagens de *Gypsy* em *Brachiaria* (Santos *et al.*, 2015). Em nosso caso, foi possível identificar sequências com boa identidade às regiões conservadas da integrase e RNaseH, além da

transcriptase reversa das linhagens de *Copia* e *Gypsy*, para o desenho de *primers* para PCR e produção de sondas. Contudo, devido à baixa cobertura dos dois sequenciamentos, não conseguimos sucesso na busca por sequências das linhagens Reina, Retrofit e Galadriel.

A literatura sugere que os retrotransposons se acumulam de modo disperso ao longo dos cromossomos das plantas, diferentemente dos DNAs satélites que formam blocos mais definidos (Heslop-harrison e Schmidt, 2007, 2011). No entanto, há exemplos que reportam que *Copia* e *Gypsy* formam um grupo heterogêneo de elementos de transposição, que podem localizar-se de modo disperso ou agrupado em blocos nos cromossomos (Belyayev *et al.*, 2001; Gaeta *et al.*, 2010). Embora nossos resultados também tenham mostrado sinais de hibridização dispersos e agrupados, muitas vezes como pequenos *dots*, houve uma grande variação no perfil de hibridização entre as linhagens de *Copia* e *Gypsy*, assim como entre as espécies testadas. Em *E. montana*, por exemplo, observamos que as sondas de Oryco, Del e CRM hibridizaram em metade dos cromossomos, contrário ao que ocorreu com a sonda Athila/Tat, onde sinais em blocos foram evidentes em todos os cromossomos. Como exemplo de variação no perfil de hibridização de apenas uma sonda, notamos que a linhagem Athila/Tat em *E. niederleinii* teve uma distribuição dispersa dos sinais de FISH, com dois cromossomos maiores acumulando mais sinais, enquanto que nas demais espécies os sinais foram predominantemente em blocos. De uma maneira geral, os holocêntricos de *Eleocharis* mostraram *Copia* com uma distribuição mais dispersa, enquanto que com as sondas *Gypsy*, os sinais foram dispersos em Del e mais acumulados em blocos com as sondas Athila/Tat e CRM. Nossos resultados ampliam o conhecimento sobre a localização e a distribuição de retrotransposons em holocêntricos de plantas, já que na publicação de Heckmann *et al.* (2013), esses autores mostram holocêntricos de *Luzula elegans* (Juncaceae) com sinais dispersos usando sondas amplas das superfamílias *Copia* e *Gypsy*, e não separadas por linhagens.

A hibridização com a sonda de CRM nos chamou a atenção pela maior variação no perfil de distribuição dos sinais da FISH. CRM, descrito inicialmente como retrotransposons centroméricos de milho, foram detectados nas regiões proximais de várias espécies com cromossomos monocêntricos (Neumann *et al.*, 2011) e associados aos holocentrômeros de *R. pubera* (Marques *et al.*, 2015). Elementos do clado Cromovirus apresentam um cromodomínio terminal à cadeia poligênica e,

particularmente os da linhagem CRM, possuem um domínio *zinc finger* (HHCC) que reconhece a proteína CENH3, direcionando seu acúmulo preferencialmente nos centrômeros, o que os diferencia das demais linhagens (Houben *et al.*, 2007; Neumann *et al.*, 2011). Alguns cromossomos de *E. maculosa*, *E. elegans* e *E. montana* mostraram sinais de FISH distribuídos ao longo das cromátides, concordando com a condição holocentromérica. A localização contínua de sinais de FISH com uma sonda CRM específica (denominada CRRh) foi previamente reportada para todos cromossomos holocentroméricos das ciperáceas *Rhynchospora pubera* (Marques *et al.*, 2015) e *R. breviscula* (Rocha *et al.*, 2016). Comparando esses com os nossos resultados, notamos sinais contínuos em poucos cromossomos, além de sinais dispersos e em *dots*. Isso pode ser explicado pela qualidade da sonda, já que utilizamos PCR para amplificar uma região conservada que representasse CRM de uma maneira geral, e não um CR específico como aquele reportado por Marques *et al.* (2015), ou também pela técnica de preparo de lâminas por esmagamento, que pode dificultar o posicionamento do *groove*.

Considerações finais

Cromossomos holocêntricos de plantas vêm ganhando a atenção nos últimos anos, principalmente pela ocorrência e distribuição de DNAs satélites (Marques *et al.*, 2015; Ribeiro *et al.*, 2016), diferença na organização dos holocentrômeros na mitose e na meiose (Heckmann *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2016), e pela associação de sequências repetitiva no desenvolvimento de grãos de pólen em Cyperaceae (San Martin *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2016). No entanto, estudos sobre o papel dos retrotransposons na organização e diferenciação dos genomas e cromossomos em espécies holocêntricas ainda são escassos. O baixo volume dessas informações dificulta o estabelecimento de modelos sobre a biologia desse tipo cromossômico, assim como sobre os processos evolutivos que envolvem organismos expostos a uma maior incidência e fixação de rearranjos cromossômicos, como as disploidias comumente encontradas em Cyperaceae.

Este estudo comparativo utilizando informações sobre genômica, conteúdo de DNA, citogenética molecular mostrou que: i) cromossomos rearranjados acumularam mais retrotransposons quando comparados aos demais, como apresentado em *E. niederleinii*; ii) os poliploides com os maiores níveis de ploidia e de Cx, apresentaram mais sinais de FISH do que os diploides, como por exemplo na comparação entre *E. montana* e *E. maculosa*; iii) cada sonda de cada linhagem exibiu padrões de

hibridização *in situ* que diferiram dentro e entre os cariótipos, sugerindo que as hibridizações com sondas gerais de *Copia* e *Gypsy* são menos informativas que as aquelas das linhagens individualizadas; iv) embora não tenhamos uma quantificação precisa de *Cx versus* a quantidade de retrotransposons por linhagem, foi possível perceber que houve acúmulo maior de sinais de FISH com as sondas Athila/Tat e CRM de *Gypsy* do que aquelas de *Copia*, como por exemplo em *E. montana*. Pelo menos para o clado Athila/Tat a FISH concorda com a elevada porcentagem observada na análise genômica e v) concluímos também que, exceto pela linhagem CRM que hibridizou de maneira contínua nos holocentrômeros, não houve regiões cromossômicas específicas ou *hotspots* para a ocorrência das linhagens em geral.

Agradecimentos

Os autores agradecem às fontes fomento CNPq, CAPES, FINEP e Fundação Araucária pelos recursos investidos. Agradecemos também à ProPPG-UEL e PPG-GBM pela logística e apoio.

Referências bibliográficas

- Belyayev A, Raskina O, Nevo E. 2001.** Chromosomal distribution of reverse transcriptase-containing retroelements in two Triticeae species. *Chromosome Research*, **9**: 129-136.
- Bennet MD, Leitch IJ. 1995.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* **76**:113-176.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals Botany* **107**:467–590.
- Bennetzen JL. 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* **42**:251–269.
- Bennetzen, JL, Wang H. 2014.** The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annual review of plant biology*, v. **65**:505–30.
- Bozek M, Leitch AR, Leitch IJ. et al. 2012.** Chromosome and genome size variation in *Luzula* (Juncaceae), a genus with holocentric chromosomes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**:529-541.
- Bures P, Zedek F. 2014.** Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* **68**: 2412–2420.
- Chen ZJ. 2010.** Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in plant science* **15**:57-71.

- Chung KS, Weber JA, Hipp AL. 2011.** Dynamics of chromosome number and genome size variation in a cytogenetically variable sedge (*Carex scoparia* var. *scoparia*, Cyperaceae). *American Journal of Botany* **98**:122–129.
- Chung KS, Hipp AL, Roalson EH. 2012.** Chromosome number evolves independently of genome size in a clade with nonlocalized centromeres (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution* **66**:2708-2722.
- D'Hont A, Denoeud F, Aury JM, Baurens FC. 2012.** The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, **488**:213-217.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela, ALL. 2005.** Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Botanical Journal of the Linnean Society* **149**: 457-464.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela, ALL. 2008.** Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenetic and Genome Research* **122**:175-180.
- Da Silva, CRM, et al. 2010a.** Karyotypic diversification and its contribution to the taxonomy of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Brazil. *Australian Journal of Botany*. **58**: 49-60.
- Da Silva CRM et al. 2016.** Genome differentiation, natural hybridization and taxonomic relationships between *Eleocharis viridans*, *E. niederleinii* and *E. ramboana* (Cyperaceae). *Australian Systematic Botany*. Submitted
- Devos, KM. 2010.** Grass genome organization and evolution. *Current opinion in plant biology* **13**:139-145.
- Dixit A, Ma KH, Yu JW, et al. 2006.** Reverse transcriptase domain sequences from Mungbean (*Vigna radiata*) LTR retrotransposons: sequence characterization and phylogenetic analysis. *Plant cell reports* **25**:100-111.
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. 2007.** Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* **2**:2233–2244.
- Evgen'ev, MB. 2007.** Mobile elements and genome evolution. *Molecular Biology*, **41**:203-213.
- Ferreira DF. 2011** Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)* **35**:1039-1042.
- Ferreira DF. 2014.** Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia* **38**:109-112.
- Gaeta ML, Yuyama PM, Sartori D, et al. 2010.** Occurrence and chromosome distribution of retroelements and NUPT sequences in *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae). *Chromosome Research* **18**:515-524.
- Galasso I, Harrison GE, Pignone D, et al. 1997.** The Distribution and Organization of Ty1-copia-like Retrotransposable Elements in the Genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its Relatives. *Annals of Botany* **80**:327-333.

- González-Elizondo MS, Peterson PM. 1997.** A classification of and key to the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). *Taxon* **46**:433–449.
- Grandbastien, MA. 2015.** LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant regulation and stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1849**:403-416.
- Grover CE, Wendel JF. 2010.** Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany*.
- Guerra M, Souza MJ. 2002.** Como observar cromossomos. 1ª ed. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC.
- Heckmann S, et al. 2013.** The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *The Plant Journal* **73**:555-565.
- Heckmann S. et al. 2014.** Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nature Communications* **5**: 4979.
- Heslop-Harrison JS, Schmidt T. 2007.** Plant Nuclear Genome Composition. *Encyclopedia of Life Sciences* 1–8.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T. 2011.** Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant Journal* **66**:18-33.
- Hipp AL, Escudero M. 2013.** Holocentric Chromosomes. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. **3**: 499-501.
- Hoshino T. 1987.** Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. *Bulletin of Okayama University Science* **22**:305–312.
- Houben A, Schroeder-Reiter E, Nagaki K, et al. 2007.** CENH3 interacts with the centromeric retrotransposon cereba and GC-rich satellites and locates to centromeric substructures in barley. *Chromosoma* **116**: 275-283.
- Janicki M, Rooke R, Yang G. 2011.** Bioinformatics and genomic analysis of transposable elements in eukaryotic genomes. *Chromosome research* **19**:787.
- Jurka, J, et al. 2007.** Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annual Review of Genomics and Human. Genetetics*. **8**: 241-259.
- Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E, Schulman AH. 2000.** Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**: 6603-6607.
- Knight, CA, Jeremy M. 2008.** Beaulieu. "Genome size scaling through phenotype space. *Annals of Botany* **101.6**: 759-766.
- Langdon T, Seago C, Mende M, et al. 2000.** Retrotransposon evolution in diverse plant genomes. *Genetics* **156**:313-325.
- Liu, Y. et al. 2016.** A *Gossypium* BAC clone contains key repeat components

distinguishing sub-genome of allotetraploidy cottons. *Molecular cytogenetics* **9**:27.

Llorens C, et al. 2009. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biology direct* **4**:41.

Luceño M., GUERRA M.1996. Numerical variations in species exhibiting holocentric chromosomes: A nomenclatural proposal. *Caryologia* **49**:301–309.

Marques A. et al. 2015. Correction for Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:13633–13638.

Marques A. et al. 2016. Restructuring of Holocentric Centromeres During Meiosis in the Plant *Rhynchospora pubera*. *Genetics* **204**:1-38.

Masterson J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* **264**:421-423.

Matsumoto T, et al. 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **326**: 793-800.

Ming R, VanBuren R, Wai CM, et al. 2015. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nature genetics* **47**:1435-1442.

Neumann P, et al. 2011. Plant centromeric retrotransposons: a structural and cytogenetic perspective. *Mobile DNA* **2**:4.

Paterson AH, Bowers JE, Bruggmann R, Dubchak I, et al. 2009. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* **457**:551-556.

Ribeiro T. et al. 2016. Centromeric and non-centromeric satellite DNA organisation differs in holocentric *Rhynchospora* species. *Chromosoma*.

Roalson EH .2008. A synopsis of chromosome number variation in the cyperaceae. *Botanical Review* **74**:209-393.

Rocha DM, et al. 2016. Developmental programmed cell death during asymmetric microsporogenesis in holocentric species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Journal of Experimental Botany*, 1-11.

Romano E, Cristina A, Brasileiro M.1998. Extração de DNA de plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 40–43.

Santos FC. et al. 2015. Chromosomal distribution and evolution of abundant retrotransposons in plants: gypsy elements in diploid and polyploid *Brachiaria* forage grasses. *Chromosome Research* **23**:571–582.

Schnable PS, Ware D, Fulton RS, et al. 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* **326**:1112-1115.

San Martin JAB, et al. 2013. Asymmetric cytokinesis guide the development of pseudomonads in *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Cell biology international* **33**: 1118-1118.

- Svenson HK.1929.** Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. *Harvard University. Gray.* **86:**121–242.
- Tenaillon MI, Hufford MB, Gaut BS, et al.2011.** Genome size and transposable element content as determined by high-throughput sequencing in maize and *Zea luxurians*. *Genome biology and evolution* **3:** 219-229.
- Trevisan R. 2009.** *Eleocharis (Cyperaceae) na Região Sul do Brasil.* Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 225p.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M.2003.** Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology.* **26:**199–201.
- Vicient CM, Suoniemi A, Ananthawat-Jónsson K, et al. 1999.** Retrotransposons BARE-1 and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*. *Plant Cell.* **11:**1769-1784.
- Vogel JP. et al. 2010.** Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature* **463:**763-768.
- Wicker, T et al. 2007.** A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature reviews. Genetics.* **8:** 973–982.
- Yan H, Martin SL, Bekele WA, et al. 2016.** Genome size variation in the genus *Avena*. *Genome* **59:**209-220.
- Zedek F, et al.2010.** Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. *BMC plant biology* **10:**1-10.

Anexo 1

Quadro S1. Distribuição das principais classes de DNAs repetitivos nos genomas parcialmente sequenciados de *E. elegans* e *E. geniculata*. Num seq. = número de fragmentos, RN (%) = número relativo (*relative number*), size pb. = tamanho total dos fragmentos em pares de bases e RS (%) = tamanho relativo (*relative size*).

Species / Lineages		<i>E. elegans</i>				<i>E. geniculata</i>			
		seq. num.	RN (%)	size bp	RS (%)	seq. num.	RN (%)	size bp	RS (%)
Copia	Oryco	497	5.48	26280	5.65	23	3.11	1300	2.58
	Sire	1015	11.19	55106	11.84	112	15.14	7186	14.27
	Retrofit	715	7.88	38944	8.37	44	5.95	2297	4.56
	Tork	396	4.37	20254	4.35	58	7.84	4754	9.44
Total Copia		2623	28.92	140584	30.21	237	32.03	15537	30.85
Gypsy	Del	176	1.94	9702	2.09	6	0.81	328	0.65
	Reina	278	3.06	15557	3.34	15	2.03	676	1.34
	CRM	334	3.68	18046	3.88	14	1.89	595	1.18
	Galadriel	2	0.02	67	0.01	0	0.00	0	0.00
	Tat	1062	11.71	55467	11.92	69	9.32	4985	9.90
	Athila	1100	12.13	55988	12.03	125	16.89	8725	17.33
Total Gypsy		2952	32.54	154827	33.27	229	30.95	15309	30.40
Bel		1	0.01	47	0.01	0	0.00	0	0.00
DIRS		0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total LTRs		5576	61.47	295458	63.50	466	62.97	30846	61.25
LINE	L1	1097	12.09	56885	12.23	89	12.03	5045	10.02
	RTE	114	1.26	5323	1.14	12	1.62	798	1.58
SINE		1	0.01	24	0.01	0	0.00	0	0.00
Total Non-LTRs		1212	13.36	62232	13.37	101	13.65	5843	11.60
Total Class 1		6788	74.83	357690	76.87	567	76.62	36689	72.85
Virus-like	Caulimovirus	3	0.03	154	0.03	0	0.00	0	0.00
	Soymovirus	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	Cavemovirus	1	0.01	21	0.00	0	0.00	0	0.00
	Tungrovirus	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	Badnavirus	368	4.06	19004	4.08	24	3.24	1521	3.02
	Pararetrovirus	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	Errantiviridade	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Total Virus-like		372	4.10	19179	4.12	24	3.24	1521	3.02
Transposons	Cacta	542	5.98	28610	6.15	27	3.65	2249	4.47
	hAT	734	8.09	25918	5.57	71	9.59	3508	6.97
	Harbinger	32	0.35	1760	0.38	1	0.14	74	0.15
	MuDR	414	4.56	17556	3.77	25	3.38	1216	2.41
Helitrons		163	1.80	8868	1.91	11	1.49	569	1.13
Total Class 2		1885	20.78	82712	17.78	135	18.24	7616	15.12
Others seqs.		26	0.29	5721	1.23	14	1.89	4533	9.00
TOTAL		9071	100.00	465302	100.00	740	100.00	50359	100.00

Anexo 2

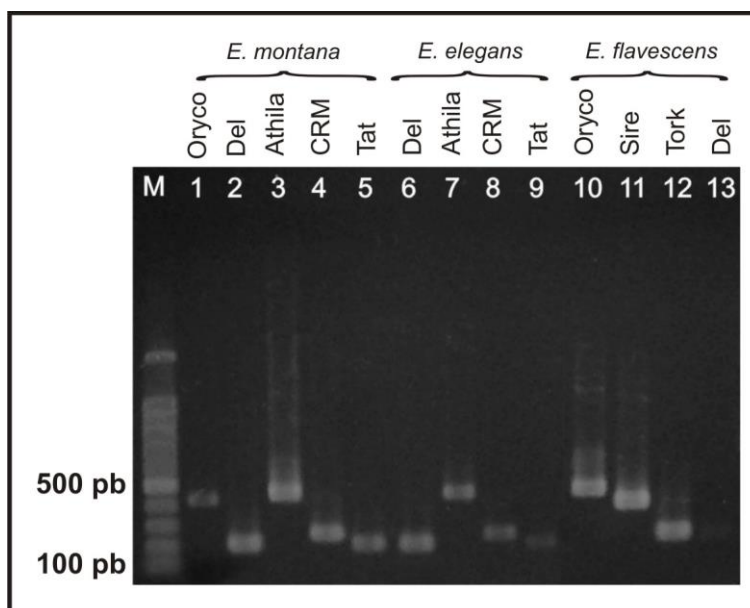


Figura S1. Produtos das PCRs com *primers* para linhagens de retrotransposons. (A) **1 a 5** *E. montana* com *primers* Oryco, Del, Athila, CRM, Tat; **6 a 9** *E. elegans* com *primers* Del, Athila, CRM e Tat; **10 a 13** *E. flavescens* com *primers* Oryco, Sire, Del e Tork, respectivamente, onde: M = Marcador de 100pb.

CONCLUSÕES FINAIS

- 1) Nossos resultados mostram que, mesmo utilizando um sequenciamento de baixa cobertura, foi possível estudar a diversidade dos retrotransposons, bem como avaliar e comparar a localização de suas linhagens nos cromossomos de *Eleocharis*.
- 2) A citometria de fluxo mostrou que os retrotransposons não foram os principais causadores das diferenças quantidade de DNA nuclear nesse gênero. Essa variação foi gerada principalmente pela poliploidia, demonstrada pela correlação positiva entre os valores C de DNA e o número cromossômico.
- 3) Os poliploides com os maiores níveis de ploidia e de Cx , apresentaram mais sinais de FISH do que os genomas diploides.
- 4) As sondas específicas para as linhagens apresentaram diferentes perfis de hibridização, sendo notadas diferenças intracariotípicas e interespecíficas. Isso sugere que quando usamos sondas específicas para cada linhagem, a heterogeneidade entre elas fica mais evidente do que quando são utilizadas sondas generalistas de *Copia* e *Gypsy*.
- 5) A FISH mostrou que houve um acúmulo maior de sinais de retrotransposons em cromossomos derivados de rearranjos, como em *E. niederleinii*.
- 6) Embora não tenhamos uma relação precisa entre a quantidade de DNA do complemento monoploide e a quantidade de retrotransposons por linhagem, exceto pelas porcentagens obtidas *in silico*, percebemos que houve maior acúmulo de sinais na FISH com as sondas Athila/Tat e CRM, do que aquelas de *Copia*.
- 7) Os sinais de hibridização vistos para o clado Athila/Tat concordam com a elevada porcentagem observada na análise genômica, permitindo concluir que, exceto pela linhagem CRM que hibridizou de maneira contínua nos holocentrômeros de alguns cromossomos, não houve regiões cromossômicas específicas ou *hotspots* para a ocorrência das linhagens em geral.
- 8) A ocorrência e a distribuição de retrotransposons nos holocêntricos de *Eleocharis* não mostram, de fato, que os holocêntricos têm mecanismos especiais de rearranjos que os diferem dos monocêntricos, do ponto de vista dos retrotransposons.