



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VANESSA SILVA MICHELAN

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS E  
MOLECULARES EM ESPÉCIES RELACIONADAS À  
*Rhynchospora tenuis*, SEÇÃO *Tenues* (CYPERACEAE)**

Londrina  
2011

VANESSA SILVA MICHELAN

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS E  
MOLECULARES EM ESPÉCIES RELACIONADAS À  
*Rhynchospora tenuis*, SEÇÃO *Tenues* (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  
2011

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

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

M623a Michelan, Vanessa Silva.  
Análises morfológicas, citogenéticas e moleculares em espécies relacionadas à *Rhynchospora tenuis*, seção *Tenuis* (Cyperaceae) / Vanessa Silva Michelan. – Londrina, 2011.  
44 f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.  
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.  
Inclui bibliografia.

1. Cyperaceae – Teses. 2. *Rhynchospora tenuis* – Teses. 3. Taxonomia vegetal – Teses. 4. Citogenética vegetal – Teses. 5. Cromossomos vegetais – Teses. 6. Cariótipos – Teses. 7. Meiose – Teses. I. Vanzela, André Luis Laforga. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 582.542.2

VANESSA SILVA MICHELAN

**ANÁLISES MORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS E MOLECULARES  
EM ESPÉCIES RELACIONADAS À *Rhynchospora tenuis*, SEÇÃO *Tenues*  
(CYPERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela  
UEL – Londrina – PR

---

Profa. Dra. Andréa Beatriz Mendes Bonato  
UEM – Maringá – PR

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Lúcia Giuliano Caetano  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus queridos pais Maria e Djamir e  
a minha irmã Aline.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Maria e Djamir e a minha irmã Aline por todo amor e compreensão.

Às minhas amigas Poly, Edihanne, Priscila e Carol pelo apoio e amizade.

Ao meu orientador, Prof. André, pelo aprendizado.

Às minhas amigas Angélica, Sté, Paula, Vivi e Vivian pela amizade e por sempre torcerem por mim.

Ao Prof. Laurival pelos auxílios e incentivos.

A todos os amigos e funcionários do LABRE pela grande ajuda.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

À Maria Sueli Trindade Miranda pela ajuda, disposição e paciência.

Aos professores e alunos da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pelo grande aprendizado e amizade.

Ao Dário e a Melissa pelo apoio técnico.

Ao Dr. Rafael Trevisan pela identificação das espécies estudadas.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que me ajudaram ou torceram pelo meu sucesso.

Muito Obrigada!

MICHELAN, Vanessa Silva. **Análises morfológicas, citogenéticas e moleculares em espécies relacionadas à *Rhynchospora tenuis*, seção *Tenues* (Cyperaceae)**. 2011. 44 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

O gênero *Rhynchospora* pertence a família Cyperaceae, a terceira maior família das monocotiledôneas. *Rhynchospora* apresenta cerca de 270 espécies organizadas em 27 seções, entre elas a seção *Tenues* a qual inclui de 17 a 20 espécies, sendo que 14 delas ocorrem no Brasil. Esta diferença observada no número de espécies descritas para a seção é devida principalmente ao complexo *Rhynchospora tenuis*, o qual pode englobar ou não *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis*, *R. riparia* e *R. emaciata*, de acordo com os critérios diagnósticos de cada taxonomista. *Rhynchospora riparia* e *R. emaciata* apresentam características marcantes que as distinguem de *R. tenuis*, sendo a maior confusão taxonômica, presente nas delimitações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. Estudos citogenéticos desenvolvidos em *Rhynchospora* mostraram que este, assim como a família Cyperaceae, apresenta cromossomos holocêntricos. A condição holocinética favorece a manutenção de variações cromossômicas numéricas associadas a eventos de disploidia. Embora, variações associadas a disploidia ocorram em *Rhynchospora*, a poliploidia é considerada como o principal mecanismo envolvido na evolução cariotípica do grupo. Neste estudo, amostras de *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e de *R. junciformis* foram analisadas de modo comparativo, empregando análises morfológicas, citogenéticas e de marcadores moleculares (ISSR). As relações entre esses táxons foram discutidas baseadas no valor dos caracteres diagnósticos comumente empregados na identificação dessas espécies, buscando uma melhor resolução taxonômica para o complexo *Rhynchospora tenuis*. As medidas morfológicas obtidas para as espécies estudadas exibiram sobreposições nos valores para praticamente todos os caracteres avaliados. Contudo, a forma dos aquênios e dos estilopódios, o número de espiguetas terminais, o número cromossômico e a análise de marcadores ISSR, quando observados conjuntamente, mostraram-se úteis para propor uma nova relação entre estes quatro táxons da seção *Tenues*. Nas análises citogenéticas, *R. tenuis* apresentou  $2n = 4$ , com dois sinais terminais de DNAr 45S enquanto que *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis* apresentaram  $2n = 18$ , com seis sinais terminais de DNAr 45S. A análise meiótica feita em *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* mostrou sete bivalentes e um tetravalente, sugerindo que a origem do número cromossômico  $2n = 18$  esteja envolvida com eventos de poliploidia associado a disploidia. Os dendogramas obtidos com os dados de ISSR mostraram *Rhynchospora tenuis* alocada separadamente de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*, as quais foram agrupadas em um mesmo ramo. Estas duas espécies apareceram mais próximas de *R. junciformis* do que de *R. tenuis*. O uso conjunto de análises morfológicas, citogenéticas e de genética molecular gerou resultados que apontaram para um novo caminho em direção à resolução de problemas taxonômicos relacionados à seção *Tenues*. Esses resultados indicaram a necessidade de uma reavaliação do status de algumas espécies, sobretudo no que diz respeito à elevação de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* ao nível de espécie: *R. austro-brasiliensis*, e a inclusão de *R. enmanuelis* como sinonímia de *R. austro-brasiliensis*.

**Palavras-chave:** Cromossomo holocêntrico. Displóidia. Taxonomia. ISSR. *Rhynchospora tenuis*. *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*.

MICHELAN, Vanessa Silva. **Morphological, cytogenetical and molecular analysis in species related to *Rhynchospora tenuis*, section *Tenues* (Cyperaceae)**. 2011. 44 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

The genus *Rhynchospora* belongs to Cyperaceae family, the third largest of monocots. *Rhynchospora* has about 270 species organized into 27 sections, including *Tenues* section, which includes 17 to 20 species, 14 of them occurring in Brazil. This difference in the number of described species for the section is mainly due to the complex *Rhynchospora tenuis*, which can include or not *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis*, *R. riparia* and *R. emaciata*, according to the diagnostic criterion for each taxonomist. *Rhynchospora riparia* and *R. emaciata* exhibit striking characteristics that distinguish them from *R. tenuis*, the largest taxonomic confusion present in the delimitations between *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* and *R. enmanuelis*. Progress cytogenetic studies with *Rhynchospora* showed that, as well as family Cyperaceae, it presents holocentric chromosomes. The holokinetic condition favors the maintenance of chromosome number variations associated with dispoloidy events. Although variations associated with dispoloidy occur in *Rhynchospora*, polyploidy is considered as the main mechanism involved in the karyotype evolution of the group. In this study, samples of *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* and *R. junciformis* were analyzed in a comparative way, using morphological, cytogenetic and molecular markers (ISSR). The relationships among those taxa were discussed based on the value of diagnostic characters commonly used in the identification of these species, seeking a better taxonomic resolution to the complex *Rhynchospora tenuis*. The morphological measurements obtained for the species showed overlays in values to almost all evaluated characters. However, the form of achenes and style basis, the number of terminal spikelets, the number of chromosome and ISSR analysis, when observed together, have proved to be useful to propose a new relationship among those four taxa of section *Tenues*. In cytogenetic analysis, *R. tenuis* presented  $2n = 4$ , with two terminal signs of 45S rDNA, while *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* and *R. junciformis* had  $2n = 18$ , with six 45S rDNA terminal signs. The meiotic analysis in *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* showed seven bivalents and one quadrivalent, suggesting that the origin of the chromosome number  $2n = 18$  is involved with events associated with polyploidy and dispoloidy. The dendrograms obtained with ISSR data showed *Rhynchospora tenuis* allocated separately of *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* and *R. enmanuelis*, which were grouped in the same branch. These two species appeared closer to *R. junciformis* than *R. tenuis*. The combined use of morphologic, cytogenetic and molecular genetics analyses generated results that pointed to a new path toward problems resolution related to the taxonomic *Tenues* section. These results indicated the need for a reassessment of the status of some species, particularly with regard to the increase of *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* to species level: *R. austro-brasiliensis*, and the inclusion of *R. enmanuelis* as a synonym of *R. austro-brasiliensis*.

**Keywords:** Chromosome holocentric. Dispoloidy. Taxonomy. ISSR, *Rhynchospora tenuis*. *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Imagens de caracteres morfológicos das espécies estudadas .....	40
<b>Figura 2</b> – Imagens das análises cromossômicas .....	41
<b>Figura 3</b> – Imagem de gel de agarose evidenciando as bandas geradas pela reação de PCR com o <i>primer</i> de ISSR GA <sub>9</sub> +C.....	42
<b>Figura 4</b> – Dendograma baseado no método de agrupamento UPGMA e no coeficiente de Nei e Li (1979).....	43
<b>Figura 5</b> – Dendograma baseado no método de parcimônia de Dollo .....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	A FAMÍLIA CYPERACEAE.....	9
1.2	O GÊNERO RHYNCHOSPORA.....	10
1.3	A SEÇÃO TENUES.....	11
1.4	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE CYPERACEAE.....	13
1.5	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE RHYNCHOSPORA.....	14
1.6	ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA SEÇÃO TENUES.....	15
1.7	LOCALIZAÇÃO DE DNA RIBOSSÔMICO 5S E 45S.....	16
1.8	MARCADORES ISSR.....	16
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	18
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
	<b>ARTIGO: ANÁLISES MORFOLÓGICAS, CITOGENÉTICAS E MOLECULARES APONTAM UMA NOVA DELIMITAÇÃO PARA ESPÉCIES RELACIONADAS À RHYNCHOSPORA TENUIS, SEÇÃO TENUES (CYPERACEAE)</b> .....	24
	INTRODUÇÃO.....	26
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
	RESULTADOS.....	30
	DISCUSSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS.....	36
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	44

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A FAMÍLIA CYPERACEAE

Cyperaceae Juss. é a terceira maior família das monocotiledôneas. Esta família, juntamente com Thurniaceae Engl. e Juncaceae Juss. formam a ordem Cyperales (DAHLGREN et al., 1985). Cyperaceae é bem delimitada taxonomicamente, embora os estudos dentro da família sejam difíceis, devido ao fato de seus representantes possuírem flores reduzidas e inflorescências altamente condensadas (MUASYA et al., 1998).

Bruhl (1995) dividiu Cyperaceae em duas subfamílias, Cyperoideae e Caricoideae, e 12 tribos, sendo *Rhynchospora* Vahl pertencente à subfamília Caricoideae e a tribo Rhynchosporeae. Goetghebeur (1998) reconheceu duas subfamílias adicionais, Mapanioideae e Sclerioideae, incluídas em Caricoideae por Bruhl (1995). Além disso, Goetghebeur (1998) organizou Cyperaceae em 14 tribos, alocando *Rhynchospora* na subfamília Cyperoideae e na tribo Schoeneae.

A divisão de Cyperaceae em apenas duas subfamílias é bem aceita por Simpson et al. (2007) e Muasya et al. (1998; 2009), os quais fizeram análises filogenéticas utilizando o sequenciamento do gene *rbcL*. Esses autores também reconheceram a tribo Rhynchosporeae, englobando *Rhynchospora* e *Pleurostachys* Brongn., como proposto por Bruhl (1995). Neste caso, a utilização de dados moleculares foi relevante para os estudos das delimitações taxonômicas dentro de Cyperaceae.

Cyperaceae é composta por mais de 5.500 espécies organizadas em 109 gêneros (GOVAERTS et al., 2007). Seus integrantes apresentam distribuição cosmopolita, sendo frequentes em ambientes abertos e alagados, como margens de rios e corpos d'água, embora também ocorram espécies em bordas de florestas e ambientes mais drenados (TREVISAN et al., 2008). De acordo com Alves et al. (2009), no Brasil, foram catalogadas 678 espécies de Cyperaceae, agrupadas em 42 gêneros, correspondendo cerca de 20% das espécies e 40% dos gêneros descritos para a família. Segundo estes mesmos autores, os cinco gêneros mais abundantes são *Rhynchospora* (157 spp), *Cyperus* L. (101 spp), *Scleria* P. J. Bergius (82 spp), *Eleocharis* R. Brown (69 spp) e *Bulbostylis* Kunth. (50 spp).

As espécies de Cyperaceae são encontradas em todas as regiões geográficas do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudoeste e Sul), sendo a Norte a mais rica em

gêneros, com 34, e juntamente com a Sudoeste as mais ricas em espécies com 350 cada. Não há gêneros endêmicos no Brasil, porém, 203 espécies são endêmicas. Destas, 40 pertencem ao gênero *Rhynchospora*, correspondendo a aproximadamente 16% das espécies descritas para o gênero (ALVES et al., 2009).

As Cyperaceae têm em geral, pequeno porte, porém, algumas espécies, como as do gênero *Gahnia* J.R.Forst. & G.Forst., podem alcançar tamanhos maiores, chegando a 10 m de altura. Independente dos gêneros as quais pertençam, as espécies podem ser anuais ou perenes, com hábito de crescimento cespitoso ou rizomatoso. O caule é simpodial ou monopodial, geralmente ereto, indiviso, de forma prismática, triangular ou cilíndrica, podendo ser liso ou escabroso. As folhas são geralmente alternas espiraladas, linear-lanceoladas, com bainha bem desenvolvida. As espécies são raramente dióicas, apresentando flores unissexuais ou bissexuais, reunidas em inflorescências, formadas por um conjunto de espiguetas. Os estames são geralmente de um a três, podendo ser mais numerosos. O ovário é bicarpelar ou tricarpelar, geralmente unilocular, contendo apenas um óvulo. As espécies apresentam geralmente dois ou três estigmas e o fruto é seco do tipo aquênio (BARROS, 1960; DAHLGREN et al., 1985).

As espécies desta família apresentam um papel importante na composição sucessional de áreas sujeitas à ação antrópica (TREVISAN et al., 2008). Além disso, algumas são específicas de determinados habitats, podendo ser utilizadas como bioindicadores (ALVES et al., 2009). A importância econômica do grupo é limitada a poucas espécies, como por exemplo, *Cyperus papyrus* L., utilizada na produção de papel, *Cyperus alternifolius* L. utilizada como planta ornamental e *Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch. e *Cyperus esculentus* L., cujos tubérculos servem à alimentação humana. Algumas espécies se destacam como invasoras, principalmente em culturas de arroz como a conhecida tiririca, *Cyperus rotundus* L. (<<http://www.kew.org/science/cyperaceae.html>>. Acesso em: 08 ago. 2010).

## 1.2 O GÊNERO *RHYNCHOSPORA*

Os estudos taxonômicos em *Rhynchospora* foram desenvolvidos principalmente por Kükenthal (1949; 1950; 1951) o qual, assim como Bruhl (1995), alocou *Rhynchospora* como pertencente a tribo Rhynchosporae juntamente com o gênero *Pleurostachys*. Kükenthal (1949) organizou o gênero em dois subgêneros, baseado na divisão do estilete, *Haplostileae* Kükenth. e *Diplostileae* Kükenth., e em 27 seções. O subgênero

*Haplostileae* é formado por 7 seções e *Diplostileae* por 20 seções, entre elas a seção *Tenues* Kükenth.

O gênero *Rhynchospora* é caracterizado por apresentar inflorescências em corimbo, antela ou panícula, sendo uma terminal acompanhada por inflorescências laterais. As espiguetas são arredondadas, ovóides a lanceoladas ou linear-lanceoladas, imbricadas em espiral, e espalham-se apenas quando o fruto está completamente maduro, e as glumas são geralmente espiraladas. As flores são geralmente hermafroditas ou masculinas por aborto do gineceu. Em algumas espécies as cerdas periânticas persistem na base do ovário mesmo nos frutos maduros. Os aquênios são oblongos, obovóides ou ovóides e com persistência da base do estilete. O estilete é largo na base, estreitando-se para o ápice, indiviso, bilobado ou profundamente bífido (BARROS, 1960; ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006).

Os representantes desse gênero podem variar de 10 cm a três metros de altura, sendo a maioria das espécies perenes (STRONG, 2006). *Rhynchospora* apresenta cerca de 270 espécies, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e temperadas, com uma maior concentração no continente americano (GUAGLIANONE, 2001; STRONG, 2006). No Brasil esse gênero é representado por 157 espécies, sendo que 23 delas ocorrem em todas as regiões geográficas (ALVES et al., 2009).

### 1.3 A SEÇÃO *TENUES*

A seção *Tenues* é caracterizada por apresentar espécies de pequeno porte, com menos de 50 cm, colmos filiformes, folhas filiformes canaliculadas ou raramente planas glabras, aquênios com rugas transversais e estilopódios não inclusos numa depressão do ápice do aquênio. As espécies dessa seção possuem inflorescências em corimbo, sendo um principal e um a quatro laterais, com poucas espiguetas. As espiguetas são ovadas ou obovadas, raramente lanceoladas ou cilíndricas, com glumas arrançadas em espiral. As flores basais são hermafroditas e a superior geralmente masculina ou estéril. Os aquênios não possuem cerdas periânticas, os estiletos são longos, tênues e profundamente bífidos com uma base cônica ou piramidal geralmente bilobada, com os lobos se estendendo ao longo do ápice do aquênio (KÜKENTHAL, 1951; ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006).

A seção *Tenues* pode incluir até 20 espécies, sendo 17 descritas por Kükenthal (1951), além de outras três consideradas por Rocha e Luceño (2002), sendo que 14

delas ocorrem no Brasil (ALVES et al., 2009). Essa diferença observada no número de espécies descritas é devida principalmente ao complexo *Rhynchospora tenuis*, o qual pode englobar ou não *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* T. Koyama, *R. enmanuelis* Luceño & Rocha, *R. riparia* (Nees) Boeck. e *R. emaciata* (Nees) Boeck, de acordo com os critérios diagnósticos de cada taxonomista (KÜKENTHAL, 1951; KOYAMA, 1972; ROCHA; LUCEÑO, 2002).

*Rhynchospora emaciata* pode ser diferenciada de *R. tenuis* por possuir espiguetas geralmente solitárias, aquênios com aparência quadrangular com um distinto estipe em sua base e espiguetas mais longas (STRONG, 2006). *Rhynchospora riparia* pode ser diferenciada de *R. tenuis* por apresentar duas protuberâncias ovais a redondas em ambos os lados da base dos aquênios, folhas fortemente canaliculadas grossas e mais rígidas e inflorescências congestionadas (VANZELA et al., 2000; STRONG, 2006). Além disso, *R. riparia* apresenta  $2n = 10$ , assim como *R. emaciata*, enquanto que *R. tenuis* possui  $2n = 4$  e  $8$  (VANZELA et al., 1996; VANZELA et al., 2000). *Rhynchospora riparia* e *R. emaciata* apresentam características marcantes que as distinguem de *R. tenuis*, sendo a maior confusão taxonômica presente nas delimitações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*.

*Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* foi descrita por Koyama (1972) e é bem aceita por Strong (2006). Entretanto, Rocha e Luceño (2002) não reconheceram essa subespécie. Segundo Koyama (1972) *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* pode ser distinguida de *R. tenuis* por ter anteras muito curtas (0,8 - 1 mm), espiguetas menores (2 - 4 mm) e curvadas quando maduras (versus espiguetas retas), glumas membranáceas e finas (versus glumas densamente membranáceas para cartáceo) e corimbos que tendem a ser mais espaçados nos colmos. Segundo Strong (2006) *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* ainda pode ser distinguida por apresentar aquênios deprimido-obovados ou arredondado-obovados versus obovados em *R. tenuis*. Não há registros de número cromossômico para *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*.

Embora Rocha e Luceño (2002) não tenham reconhecido o táxon *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, estes autores descreveram uma nova espécie para a seção *Tenuis*, *R. enmanuelis*, a qual é muito semelhante a *R. tenuis* e a *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. *Rhynchospora enmanuelis* segundo Rocha e Luceño (2002) pode ser diferenciada de *R. tenuis* por apresentar folhas mais largas (0,5 - 1,5 mm), colmos mais longos (7,2 - 21,0 cm), inflorescência com 2 - 3 corimbos axilares (versus 1 - 2), espiguetas maiores (até 5 mm), aquênios mais compridos (1,3 - 1,5 mm), estípites maiores (até 3 mm), além de dois estames.

As demais espécies do complexo *Rhynchospora tenuis* apresentam três estames (ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006). Além disso, *R. enmanuelis* apresenta  $2n = 18$  enquanto que *R. tenuis* possui  $2n = 4$  e  $8$  (VANZELA et al., 1996; VANZELA et al., 2000).

*Rhynchospora junciformis* (Kunth) Boeck., também pertencente à seção *Tenuis*, é semelhante as demais espécies do complexo *Rhynchospora tenuis*, embora seja bem delimitada morfológicamente. *Rhynchospora junciformis* pode se diferenciada de *R. tenuis* por apresentar aquênios arredondados para oblatos (versus aquênios redondo obovados), espiguetas geralmente em grupos de dois ou solitárias nas pontas dos ramos (versus espiguetas em grupos de 4 – 7) (ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006). Não há registros sobre o número cromossômico dessa espécie.

Quanto a distribuição geográfica dessas espécies, *Rhynchospora enmanuelis* foi encontrada em apenas três locais: Represa do Sete em Tupã - SP, onde foi coletada a espécie tipo (ROCHA; LUCEÑO, 2002), São Paulo - SP e Canela - RS (VANZELA et al., 2000). *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* ocorre por toda a América do Sul (STRONG, 2006). *Rhynchospora tenuis* possui uma distribuição mais ampla, sendo encontrada nas regiões tropicais das Américas, ocorrendo desde o México, Bahamas, Cuba até o norte da Argentina (ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006). *Rhynchospora junciformis*, é endêmica da América do Sul sendo citada para quase todas as regiões do Brasil (ROCHA; LUCEÑO, 2002; STRONG, 2006).

#### 1.4 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE CYPERACEAE

Embora os estudos cromossômicos em Cyperaceae tenham começado há quase um século, com Heilborn (1918), pouco mais de 16% das espécies tiveram seus números cromossômicos descritos (ROALSON, 2008). Desses estudos, alguns se destacam por abordarem a diferenciação cariotípica na família, como por exemplo, os trabalhos desenvolvidos em *Carex* L. (LUCEÑO; CASTROVIEJO, 1991; HIPP, 2007; HIPP et al., 2009), em *Eleocharis* (DA SILVA et al., 2005; 2008b; 2010a) e em *Rhynchospora* (VANZELA et al., 1996; 2000; LUCEÑO et al., 1998).

A família Cyperaceae é conhecida por apresentar três características incomuns para a maioria das plantas, como a (i) formação de pseudomonades (na microsporogênese três dos quatro micrósporos resultantes da meiose se degeneram e apenas um

permanece viável), (ii) meiose pós-reducional (na primeira divisão meiótica há separação das cromátides irmãs, sendo esta equacional, e na segunda divisão há a separação dos cromossomos homólogos, sendo então reducional) e a (iii) ocorrência de cromossomos holocêntricos (RAMAKRISHNAN; RAMACHANDRAN, 1976; VANZELA; COLAÇO, 2002; DA SILVA et al., 2005).

Os cromossomos holocêntricos possuem cinetócoro difuso ao longo da cromátide. Dessa forma, as fibras do fuso se ligam em praticamente toda a extensão das cromátides para tracioná-las para os pólos da célula, de modo paralelo, durante a divisão. Essa característica permite que fragmentos cromossômicos gerados por quebras, sejam mantidos durante a divisão celular, o que pode favorecer a ocorrência de diferentes números cromossômicos nos cariótipos das espécies que os possui (CASTRO et al., 1949; VANZELA; COLAÇO, 2002).

A presença de cromossomos holocêntricos tem um papel importante na evolução cariotípica de Cyperaceae, a qual é marcada por uma ampla variação cromossômica, numérica e estrutural, tanto intra quanto interespecífica, atribuída a eventos de disploidia além de eventos de poliploidia (BIR et al., 1992; VANZELA et al., 2000; DA SILVA et al., 2008a; HIPP et al., 2009). Os números cromossômicos descritos para Cyperaceae variaram de  $2n = 4$  em *Rhynchospora tenuis* a  $2n = 216$  em *Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch. (VANZELA et al., 1996; PATNAIK; GURU, 1968), sendo  $x = 5$  o número básico proposto para a família (LÖVE et al., 1957).

### 1.5 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE *RHYNCHOSPORA*

*Rhynchospora* é um dos gêneros de Cyperaceae mais bem explorado em estudos citogenéticos. Os números cromossômicos descritos para o gênero variaram de  $2n = 4$  em *Rhynchospora tenuis* a  $2n = 62$  em *Rhynchospora faurieri* Franch. e *Rhynchospora chinensis* Nees & Meyen (VANZELA et al., 1996; HOSHINO, 1987). Nesse gênero há uma predominância de cariótipos com  $2n = 10, 18, 20$  e  $36$  (ROALSON, 2008). O número básico proposto para a família,  $x = 5$ , é bem aceito para *Rhynchospora*, embora nesse gênero também ocorram números secundários como  $x = 6$  e  $x = 9$  (VANZELA et al., 2000)

Além das variações encontradas entre as espécies, diferentes números cromossômicos também foram descritos para uma mesma espécie. Variações possivelmente

originadas por poliploidia foram observadas em *R. holoschoenoides* (L. C. Rich.) Herter, *R. confinis* (Nees) C.B. Clarke e *R. setigera* Boeck., todas com  $2n = 10$  e  $20$ , e *R. nervosa* (Vahl) Boeck. com  $2n = 20$  e  $30$ . *Rhynchospora globosa* (Kunth) Roem. & Schult., além de apresentar variações poliplóides,  $2n = 24$  e  $48$ , exibe também  $2n = 37$ , possivelmente originado por poliploidia associada a disploidia (LUCENÑO et al., 1998; VANZELA et al., 2000).

Luceño et al. (1998) e Vanzela et al. (2000) apontaram a poliploidia como o principal mecanismo responsável pela evolução cariotípica em *Rhynchospora*, embora variações numéricas originadas por disploidia também ocorram. A poliploidia é a variação cariotípica mais frequente em plantas, sendo o mecanismo mais comum envolvido na evolução desses indivíduos (GUERRA, 2008).

#### 1.6 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA SEÇÃO *TENUES*

Das 20 espécies descritas para a seção *Tenues* seis tiveram seus números cromossômicos publicados, sendo *R. tenuis* com  $2n = 4$  e  $8$ , este último originado por poliploidia (VANZELA et al., 1996), *R. emaciata*, *R. riparia* e *R. nanuzae* Luceño & Rocha com  $2n = 10$ , e *R. contracta* (Nees) J. Raynal e *R. enmanuelis* com  $2n = 18$  (VANZELA et al., 2000). A diversidade de números cromossômicos observados nesta seção sugere variações associadas à disploidia e a poliploidia, com complementos haplóides contendo  $n = 2$ ,  $n = 4$ ,  $n = 5$  e  $n = 9$  (VANZELA et al., 1996; VANZELA et al., 2000). Atualmente, não há registros sobre os cariótipos de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. junciformis*.

O número cromossômico  $2n = 4$  observado em *R. tenuis* é o menor número encontrado em plantas com cromossomos holocêntricos. Segundo Vanzela et al. (1996) esse cariótipo pode ter sido originado por eventos de disploidia, dessa forma,  $n = 5$  daria origem a  $n = 2$  (VANZELA et al., 1996). Eventos de disploidia também podem ter originado os cariótipos encontrados em *R. enmanuelis* e *R. contracta*, ocorrendo uma redução de  $n = 10$  para  $n = 9$  (VANZELA et al., 2000).

## 1.7 LOCALIZAÇÃO DE DNA RIBOSSÔMICO 5S E 45S

Oito espécies de *Rhynchospora* estudadas por Vanzela et al. (1998) apresentaram sinais terminais de hibridização com a sonda de DNAr 45S. Esses sinais variaram em tamanho e número, com quatro a oito sinais em cariótipos com  $2n = 10$  e até 30 sinais em cariótipos com  $2n = 50$ . *Rhynchospora tenuis* também apresentou sítios terminais de DNAr 45S, sendo localizados nos dois cromossomos menores para o diplóide com  $2n = 4$  e nos quatro menores para o tetraplóide com  $2n = 8$  (VANZELA et al., 2003).

Sinais terminais de DNAr 45S também foram localizados em 27 espécies de *Eleocharis*, assim como sinais de DNAr 5S em 19 espécies. Apenas em quatro espécies de *Eleocharis* foram observados sinais de DNAr 5S intersticiais (DA SILVA et al., 2005; 2008a; 2008b; 2010b). Em outra espécie com cromossomos holocêntricos, *Cuscuta approximata* Bab. (Cuscutaceae Dumortier) com  $2n = 28$ , apenas um par cromossômico apresentou sinal de DNAr 45S, com localização também terminal. Nessa espécie os sinais de DNAr 5S foram observados em três pares cromossômicos, com localização terminal em dois pares e subterminal em um par (GUERRA; GRACÍA, 2004). Os dados disponíveis para DNAs ribossômicos em cromossomos holocêntricos de plantas, mostraram o DNAr 45S geralmente com localização terminal nos cromossomos, já os sinais de DNAr 5S variam mais quanto a sua localização entre as espécies.

## 1.8 MARCADORES ISSR

Os marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) podem ser utilizados para inferir relações genéticas entre espécies próximas. Esta ferramenta depende da amplificação de segmentos de DNA existentes entre duas regiões idênticas de microssatélites, que se repetem e estão em orientação oposta (ZIETKIEWICZ et al., 1994). O emprego de marcadores ISSR tem a vantagem de não necessitar de informações prévias sobre o genoma alvo (REDDY, 2002). Dados gerados por esta ferramenta foram úteis para confirmar que o complexo *Cycas balansae* é formado por cinco espécies distintas, *C. tanqingii*, *C. parvula*, *C. simplicipinna*, *C. shiwandashanica* e *C. balansae* (XIAO; GONG, 2006). Este marcador também foi informativo para estimar a diversidade e as relações genéticas entre espécies

diferentes de *Morus* (AWASTHI et al., 2004). Dessa forma, esta ferramenta pode ser útil para ajudar a entender as relações genéticas entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis*.

Estudos envolvendo análises filogenéticas foram de grande utilidade para auxiliar nas delimitações das subfamílias e tribos de Cyperaceae (MUASYA et al., 1998; SIMPSON et al., 2007; MUASYA et al., 2009). Um bom exemplo do valor das análises moleculares para o estudo das relações interespecíficas foi dado para o gênero *Carex* seção *Spirostachyae* Drejer ex L.H. Bailey (ESCUADERO et al., 2008). Este trabalho relacionou dados moleculares (ITS - *Internal Transcribed Spacer*) a dados taxonômicos e edáficos. Os resultados ajudaram a esclarecer algumas relações interespecíficas dentro da seção *Spirostachyae*, e também mostrou que algumas espécies de uma seção próxima, *Elatae* Kukenth, estão agrupadas dentro de *Spirostachyae*.

## 2 JUSTIFICATIVA

A seção *Tenues* engloba um grupo de espécies cuja diversidade cariotípica envolve variações cromossômicas numéricas associadas à disploidia e a poliploidia. Além disso, este grupo apresenta problemas taxonômicos marcantes, como as delimitações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*, as quais fazem parte do complexo *Rhynchospora tenuis*. Os dados citogenéticos publicados para espécies dessa seção envolveram a contagem de números cromossômicos (*R. tenuis*, *R. emaciata*, *R. riparia*, *R. nanuzae*, *R. contracta* e *R. enmanuelis*), comportamento meiótico (*R. tenuis*), e a localização física de sequências de DNA ribossômico 45S (*R. tenuis*). Dessa forma, ampliar os estudos citogenéticos e genéticos para um número maior de espécies poderá ser de grande utilidade para auxiliar no entendimento das relações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis*. Este trabalho buscou responder as seguintes perguntas 1) *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* é realmente uma subespécie de *R. tenuis*? 2) *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* teve sua origem a partir de *R. tenuis* com  $2n = 4$ ? 3) *Rhynchospora enmanuelis* é uma sinonímia de *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*? 4) Qual a relação de *R. junciformis* com as demais espécies estudadas?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho buscou estudar e delimitar quatro táxons pertencentes à seção *Tenues*, *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis* utilizando parâmetros morfológicos, citogenéticos e marcadores moleculares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as características morfológicas das espécies estudadas;
- Comparar o número e a morfologia dos cromossomos;
- Localizar sítios de DNAr 45S por FISH;
- Obter dados de marcadores ISSR e utilizá-los para a análise das relações entre as espécies;
- Relacionar os dados morfológicos, cromossômicos e moleculares para caracterizar e delimitar cada táxon.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M.; ARAÚJO, A. C.; PRATA, A. P.; VITTA, F.; HEFLER, S.; TREVISAN, R.; BRAGANÇA, A. S.; MARTINS, G. S.; THOMAS, W. W. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia**, v.60, n.4, p.771-782, 2009.
- AWASTHI, A. K.; NAGARAJA, G. M.; NAIK, G. V.; KANGINAKUDRU, S.; THANGAVELU, K.; NAGARAJU, J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **BMC Genetics**, v.5, p.1-9, 2004.
- BARROS, M. Las Cyperaceas del Estado de Santa Catalina. **Sellowia**, v.12, p.321-369, 1960.
- BIR, S. S.; CHATHA, G.S.; SIDHU, M. K. Intraspecific variation in Cyperaceae from Punjab Plain, India. **Willdenowia**, v.22, p.133-142, 1992.
- BRUHL, J. J. Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. **Australian Systematic Botany**, v.8, p.125-305, 1995.
- CASTRO, D.; CÁMARA, A.; MALHEIROS, N. X-rays in the centromere problem of *Luzula purpurea* Link. **Genética Ibérica**, v.1, p.49-54, 1949.
- Cyperaceae. Royal Botanic Gardens.** Disponível em <<http://www.kew.org/science/cyperaceae.html>>. Acesso em: 08 ago. 2010.
- 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, p.457-464, 2005.
- DA SILVA, C. R. M.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L. L. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). **Cytogenetic and Genome Research**, v.122, p.175-180, 2008a.
- DA SILVA, C. R. M.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; REGO, L. N. A. A.; TOREZAN, J. M. D.; VANZELA, A. L. L. Cytogenetical and cytotaxonomical analysis of some Brazilian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Australian Journal of Botany**, v.56, p.82-90, 2008b.
- DA SILVA, C. R. M.; TREVISAN, R.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; FERREIRA, J. M.; VANZELA, A. L. L. Karyotypic diversification and its contribution to the taxonomy of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Brazil. **Australian Journal of Botany**, v.58, p.49-60, 2010a.
- DA SILVA, C. R. M.; QUINTAS, C. C.; VANZELA, A. L. L. Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Genética**, v.138, n.9-10, p.951-957, 2010b.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. The families of Monocotyledons. **Springer-Verlag**, Berlin, 1985, 520p.

ESCUADERO, M.; VALCÁRCEL, V.; VARGAS, P.; LUCEÑO, M. Evolution in *Carex* L. sect. *Spirostachyae* (Cyperaceae): A molecular and cytogenetic approach. **Organisms, Diversity & Evolution**, v.7, p.271-291, 2008.

GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. In The Families and Genera of Vascular Plant IV. Flowering Plants-Monocotyledons. (K. Kubitzki, ed.). **Springer-Verlag**, Berlin, p.141-190, 1998.

GOVAERTS, R.; SIMPSON, D.; BRUHL, J.; EGOROVA, T.; GOETGHEBEUR, P.; WILSON, K. World checklist of Cyperaceae. **The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens**, Kew, 2007, 765p.

GUAGLIANONE, E. R. Contribución al estudio del género *Rhynchospora* (Cyperaceae) V. sección *Longirostres* en América Austral. **Darwiniana**, v.39, n.3-4, p.287-342, 2001.

GUERRA, M.; GARCIA, M. Heterochromatin and rDNA sites distributed in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). **Genome**, v.47, p.134-140, 2004.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenet Genome Research**, v.120, p.339-350, 2008.

HEILBORN, O. Zur embryologie und Zytologie einiger *Carex*-Arten. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v.12, p.212-219, 1918.

HIPP, A. L. Non-uniform processes of chromosome evolution in sedges (*Carex*: Cyperaceae). **Evolution**, v.61, p.2175-2194, 2007.

HIPP, A. L.; ROTHROCK, P. E.; ROALSON, E. H. The Evolution of Chromosome Arrangements in *Carex* (Cyperaceae). **Botanical Review**, v.75, p.96-109, 2009.

HOSHINO, T. Karyomorphological studies on seven species of Japanese *Rhynchospora* (Cyperaceae). **La Kromosomo**, v.2, p.1557-1561, 1987.

KOYAMA, T. Cyperaceae-Rhynchosporaceae and Cladieae. **Memories of the New York Botanical Garden**, v.23, p.23-89, 1972.

KÜKENTHAL, G. Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora*. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v.74, p.375-509, 1949.

KÜKENTHAL, G. Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora*. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v.75, p.27-195, 1950.

- KÜKENTHAL, G. Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora*. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v.75, p.273-314, 1951.
- LÖVE, A.; LÖVE, D.; RAYMOND, M. Cytotaxonomic of *Carex* section Cappilares. **Canadian Journal of Botany**, v.35, p.715-761, 1957.
- LUCENÑO, M.; CASTROVIEJO, S. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion e fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. **Plant Systematics and Evolution**, v.177, p.149-159, 1991.
- LUCENÑO, 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.
- MUASYA, A. M.; SIMPSON, D. A.; CHASE, M. W.; CULHAM, A. An assessment of suprageneric phylogeny in Cyperaceae using *rbcL* DNA sequences. **Plant Systematics and Evolution**, v.211, p.257-271, 1998.
- MUASYA, A. M.; SIMPSON, D. A.; VERBOOM, G. A.; GOETGHEBEUR, P.; NACZI, R. F. C.; CHASE, M. W.; SMETS, E. Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data: current progress and future prospects. **Botanical Review**, v.75, p.2-21, 2009.
- PATNAIK, S. N.; GURU, K. M. A note on the cytotaxonomy of two species of *Eleocharis* R.Br. **55th Indian Science Congress**, v.3, p.381, 1968.
- RAMAKRISHNAN, S.; RAMACHANDRAN, K. Cytology of *Fimbristylis woodrowii*. **Nucleus**, v.19, p.20-25, 1976.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, p.9-17, 2002.
- ROALSON, E. H. A. Synopsis of Chromosome Number Variation in the Cyperaceae. **Botanical Review**, v.74, p.209-393, 2008.
- ROCHA, E. A.; LUCENÑO, M. Estudo taxonômico de *Rhynchospora* Vahl seção *Tenuis* (Cyperaceae) no Brasil. **Hoehnea**, v.29, p.189-214, 2002.
- SIMPSON, D. A.; MUASYA, A. M.; ALVES, M. V.; BRUHL, J. J.; CHASE, M. W.; FURNESS, C. A.; GHAMKHAR, K.; GOETGHEBEUR, P.; HODKINSON, T. R.; MARCHANT, A. D.; REZNICEK, A. A.; ROALSON, E. H.; SMETS, E.; STARR, J. R.; THOMAS, W. W.; WILSON, K. L.; ZHANG, X. Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data - a new *rbcL* analysis. **Aliso**, v.23, p.72-83, 2007.

- STRONG, M. T. Taxonomy and Distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America. **Contributions from the United States National Herbarium**, v.53, p.1-225, 2006.
- TREVISAN, R.; FERREIRA, P. M. A.; BOLDRINI, I. I. A família Cyperaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.6, n.3, p.217-244, 2008.
- VANZELA, A. L. L.; GUERRA, M.; LUCEÑO, M. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. **Cytobios**, v.88, p.219-228, 1996.
- VANZELA, A. L. L.; CUADRADO, A.; JOUVE, N.; LUCEÑO, M.; GUERRA, M. Multiple locations of the rDNA sites in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Chromosome Research**, v.6, p.345-349, 1998.
- VANZELA, A. L. L.; LUCEÑO, M.; GUERRA, M. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.134, p.557-566, 2000.
- VANZELA, A. L. L.; COLAÇO, W. Mitotic and meiotic behavior of gama irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). **Acta Scientiarum**, v.24, n.1, 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.
- XIAO, L. Q.; GONG, X. Genetic Differentiation and Relationships of Populations in the *Cycas balansae* Complex (Cycadaceae) and its Conservation Implications. **Annals of Botany**, v.97, p.807-812, 2006.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

**ARTIGO:**

**Análises morfológicas, citogenéticas e moleculares apontam uma nova delimitação para espécies relacionadas à *Rhynchospora tenuis*, seção *Tenues* (Cyperaceae)**

**Análises morfológicas, citogenéticas e moleculares apontam uma nova delimitação para espécies relacionadas à *Rhynchospora tenuis*, seção *Tenues* (Cyperaceae).**

Vanessa Silva Michelin, Carlos Maximiano da Silva, Rogério Fernandes de Souza, André Luís Laforga Vanzela

Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brasil. Fone: +55 43 33714509, Fax: +55 43 33714417. *E-mail* para correspondência: andrevanzela@uel.br

### Resumo

A seção *Tenues* inclui de 17 a 20 espécies, sendo que 14 delas ocorrem no Brasil. Esta diferença observada no número de espécies descritas é devida principalmente ao complexo *Rhynchospora tenuis*, o qual pode englobar ou não *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis*, *R. riparia* e *R. emaciata*, de acordo com os critérios diagnósticos de cada taxonomista. *Rhynchospora riparia* e *R. emaciata* apresentam características marcantes que as distinguem de *R. tenuis*, sendo a maior confusão taxonômica, presente nas delimitações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. Neste estudo, amostras de *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e de *R. junciformis*, foram analisadas de modo comparativo, empregando análises morfológicas, citogenéticas e de marcadores ISSR. As relações entre esses táxons foram discutidas baseadas no valor dos caracteres diagnósticos comumente empregados na identificação dessas espécies, buscando uma melhor resolução taxonômica para o complexo *Rhynchospora tenuis*. As medidas morfológicas obtidas para *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis* exibiram sobreposições nos valores para praticamente todos os caracteres avaliados. Contudo, a forma dos aquênios e dos estilopódios, o número de espiguetas terminais, o número cromossômico e a análise de marcadores ISSR, quando observados conjuntamente, mostraram-se úteis para propor uma nova relação entre esses quatro táxons da seção *Tenues*. Os dados obtidos indicaram a necessidade de uma reavaliação do status de algumas espécies, sobretudo no que diz respeito à elevação de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* ao nível de espécie: *R. austro-brasiliensis*, e a inclusão de *R. enmanuelis* como sinonímia de *R. austro-brasiliensis*.

**Palavras-chave:** Cromossomo holocêntrico. Displóidia. Taxonomia. ISSR. *Rhynchospora tenuis*. *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*.

## INTRODUÇÃO

A seção *Tenues* Kükenth. (*Diplostileae*, *Rhynchospora*) é caracterizada por apresentar espécies de pequeno porte, folhas canaliculadas, aquênios com rugas transversais e estilopódios não inclusos numa depressão do ápice do aquênio (Rocha e Luceño 2002). Esta seção pode incluir até 20 espécies, sendo 17 descritas por Kükenthal (1951), além de outras três consideradas por Rocha e Luceño (2002), dessas, 14 ocorrem no Brasil (Alves et al. 2009). A diferença no número de espécies descritas para a seção é devida principalmente ao complexo *Rhynchospora tenuis*, o qual pode englobar ou não *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* T. Koyama, *R. enmanuelis* Luceño & Rocha, *R. riparia* (Nees) Boeck. e *R. emaciata* (Nees) Boeck., de acordo com os critérios diagnósticos de cada taxonomista. *Rhynchospora riparia* e *R. emaciata* apresentam características marcantes que as distinguem de *R. tenuis* Link, sendo a maior confusão taxonômica, presente nas delimitações entre *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*.

Segundo Koyama (1972) *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* pode ser distinguida de *R. tenuis*, por ter anteras muito curtas (0,8 - 1,0 mm), espiguetas menores (2 - 4) e curvadas quando maduras (vs. espiguetas retas), glumas membranáceas e finas (vs. glumas densamente membranáceas para cartáceo) e corimbos que tendem a ser mais espaçados nos colmos. Além disso, segundo Strong (2006) *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* apresenta aquênios deprimido-obovados ou arredondado-obovados versus obovados em *R. tenuis*. *Rhynchospora enmanuelis* foi descrita recentemente por Rocha e Luceño (2002), os quais a diferenciaram de *R. tenuis* por apresentar folhas mais largas (0,5 - 1,5 mm), colmos mais longos (7,2 - 21,0 cm), inflorescências com 2 - 3 corimbos axilares (vs. 1 - 2), espiguetas maiores (até 5 mm), aquênios mais compridos (1,3 - 1,5 mm), estípites maiores (até 3 mm) e dois estames. As demais espécies pertencentes ao complexo *Rhynchospora tenuis* apresentam três estames (Rocha e Luceño 2002; Strong 2006).

Estudos citogenéticos desenvolvidos em *Rhynchospora* mostraram a presença de cromossomos holocêntricos (Vanzela et al. 1996; Vanzela e Colaço 2002; Guerra et al. 2005). A condição holocinética favorece a manutenção de variações cromossômicas numéricas, como as observadas em alguns representantes da família Cyperaceae, por exemplo, em *Carex laevigata* e *C. sociata* (Luceño e Castroviejo 1991; Ohkawa et al. 2000, respectivamente) e em *Eleocharis subarticulata* e *E. maculosa* (Da Silva et al. 2005; 2008a, respectivamente). Em *Rhynchospora*, variações cromossômicas associadas à disploidias foram observadas em *R. tenuis* e *R. globosa* Vahl (Vanzela et al. 1996; Luceño et al. 1998).

Contudo, a poliploidia parece ser o mecanismo de diferenciação cariotípica mais comum neste gênero, sendo descrita para 59% das espécies estudadas por Vanzela et al. (2000). *Rhynchospora tenuis* apresenta o menor número de cromossômicos holocêntricos descritos em plantas:  $2n = 4$  (Vanzela et al. 1996). Além de *R. tenuis* ( $2n = 4$  e  $8$ ), outras cinco espécies desta seção tiveram seus números cromossômicos publicados, *R. emaciata*, *R. riparia* e *R. nanuzae* Luceño & Rocha com  $2n = 10$ , e *R. contracta* (Nees) J. Raynal e *R. enmanuelis* com  $2n = 18$  (Vanzela et al. 2000). A diversidade de números cromossômicos observados nesta seção sugere variações associadas à disploidia e a poliploidia, com complementos haplóides contendo  $n = 2$ ,  $n = 4$ ,  $n = 5$  e  $n = 9$  (Vanzela et al. 1996; Vanzela et al. 2000).

Como mencionado anteriormente, existe um grande conflito na delimitação de *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. Neste estudo, amostras desses três táxons, além de *R. junciformis*, foram analisadas de modo comparativo, empregando análises morfológicas, citogenéticas e de marcadores moleculares ISSR. As relações entre esses táxons foram discutidas baseadas no valor dos caracteres diagnósticos comumente empregados na identificação dessas espécies, buscando uma melhor resolução taxonômica para o complexo *Rhynchospora tenuis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta e análise morfológica das amostras

Foram analisadas amostras de *Rhynchospora tenuis* (3 populações), *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* (5 populações), *R. enmanuelis* (2 populações) e *R. junciformis* (1 população), coletadas nos estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Tabela 1). As amostras de *R. enmanuelis* foram obtidas em Tupão SP, a mesma localidade de coleta da espécie tipo descrita por Rocha e Luceño (2002), além de São Paulo SP, localidade cujas amostras tiveram seus números cromossômicos contados e publicados por Vanzela et al. (2000). As amostras foram mantidas em vasos no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram feitas análises morfológicas de cinco a 10 indivíduos férteis de cada população coletada, incluindo: o tamanho das plantas, das folhas, das inflorescências, e o tamanho e forma das espiguetas, dos aquênios e dos estilopódios, além do número e tamanho dos estames, corimbos axilares, e a coloração dos aquênios. Estas análises foram feitas com o

auxílio de régua, paquímetro e lupa. As exsiccatas foram identificadas por um especialista e depositadas no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **Análises mitóticas e meióticas**

Para a obtenção de metáfases mitóticas, raízes foram coletadas e pré-tratadas com uma solução de 8HQ (8-hidroxiquinoleína), por uma hora a temperatura ambiente, seguida de 23 h. a 14 °C. Após este período, as raízes foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v: v) e diretamente utilizadas no preparo das lâminas ou mantidas a -20 °C até o uso. Para a confecção das lâminas as raízes foram digeridas em uma solução contendo celulase 2% e pectinase 20% a 37 °C por 3 h., hidrolisadas em HCl 1M a 60 °C por 10 min., dissecadas em uma gota de ácido acético 60%, cobertas por lamínula e esmagadas. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido, coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan®. As imagens das metáfases mitóticas foram capturadas separadamente com um microscópio Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX. Pelo menos cinco metáfases de cada espécie foram medidas utilizando o programa MicroMeasure 3.3.

Para as análises meióticas, anteras jovens foram coletadas e diretamente fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v: v). Para a confecção das lâminas, as anteras foram hidrolisadas em HCl 1M a 60 °C por 8 min., dissecadas em uma gota de ácido acético 60%, cobertas por lamínula e esmagadas. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido. As lâminas foram coradas com Giemsa 2% e montadas com Entellan®. Foram analisadas 64 imagens de metáfases meióticas capturadas separadamente com um microscópio Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX.

### **Hibridação *in situ***

O clone pTa71 contendo um seguimento de DNAr 45S isolado de *Triticum aestivum* L. (Gerlach e Bedbrook 1979) foi marcado com biotina-14-dATP por *nick translation*, e utilizado como sonda na hibridação *in situ* com fluorocromos (FISH). A FISH foi feita como descrito por Da Silva et al. (2008b). As lâminas foram confeccionadas como

descrito para análise mitótica por coloração convencional, contudo, sem a hidrólise ácida. As lâminas foram tratadas com RNase (100 µg/mL) e desidratadas em uma série alcoólica (70% e 100%). Sobre cada lâmina foi aplicada uma mistura de hibridação (31 µL) contendo 5 µL de sonda marcada (100 a 200 ng), 15 µL de formamida a 100%, 6 µL de polietilenoglicol a 50%, 3 µL de 20× SSC (pH 7,0), 1 µL de DNA de timo de bezerro fragmentado (100 ng/ µL) e 1 µL SDS a 10%. A mistura de hibridação foi previamente desnaturada a 70 °C, e depois mantida em gelo por 5 min. e colocada sobre a lâmina. A desnaturação/hibridização dos cromossomos foram feitas em um termociclador a 90°C por 10 min.; 50°C por 10 min. e 38°C por 5 min., e em seguida as lâminas foram levadas à estufa a 37 °C por pelo menos 12 h. As lavagens pós-hibridação foram feitas em 2× SSC, 0.1× SSC e 4× SSC/Tween 20 2%, todas a 37 °C. As sondas foram detectadas com avidina/FITC em BSA 50% (1: 100, v: v). As lavagens pós-deteção foram feitas em 4× SSC/Tween 20 2%, a temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com solução composta de glicerol (90%), 1,4-díaza-bicyclo(2,2,2)-octane (2,3%), 20 mM TrisHCl, pH 8.0 (2%), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (4%), água destilada (1,7%), e 1 µL de 2 µg/mL DAPI. As imagens foram capturadas separadamente com um microscópio Leica DM 4500 B, equipado com uma câmera DFC 300FX.

### **Extração de DNA**

A extração de DNA foi feita pelo método CTAB segundo Doyle e Doyle (1990) com modificações, onde folhas jovens foram coletadas, transferidas para um cadinho e pulverizadas em nitrogênio líquido. A este pó foi adicionado tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; b-mercaptoetanol 0,2%), e as amostras foram incubadas a 65 °C por 30 min. Em seguida foi adicionada as amostras proteinase K (1 µg/mL) e estas foram incubadas por mais 30 min. a 65 °C. Após a incubação, a solução foi centrifugada e purificada com fenol: clorofórmio (1: 1; v: v). As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1; v: v). O tubo foi homogeneizado, centrifugado e o sobrenadante foi transferido novamente para um novo tubo. Em seguida foi adicionada as amostras RNase (1 µg/mL) e estas foram incubadas a 37 °C por 30 min. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, lavado com etanol 70% e re-suspendido em 20-50 µL de água estéril ou tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM).

## PCR com *primers* de ISSR

Para as reações de PCR foram utilizados separadamente oito *primers* de ISSR (*Inter simple sequence repeat*): TGG<sub>5</sub>, GA<sub>9</sub>+C, AAG<sub>5</sub>, GTG<sub>6</sub>, GACA<sub>4</sub>, CAG<sub>5</sub>, GAG<sub>5</sub> e TGA<sub>6</sub>. As reações foram feitas para um total de 25 µL cada, com os seguintes componentes: 2,5 µL de tampão (10x), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,0 µL de dNTP (10 mM), 1,0 µL de *primer* (5 µM), 0,13 µL de *Taq* DNA polimerase (5U/ µL), 2,0 µL de DNA da amostra (10 ng/ µL) e 15,37 µL de H<sub>2</sub>O estéril. A PCR ocorreu de acordo com as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min., seguida por 36 ciclos a 94 °C por 1 min., 45 °C por 30 seg. e 72 °C por 1 min., ao final uma etapa de extensão a 72 °C por 5 min. Os produtos das reações de PCR (5 µL) foram aplicados em gel de poliacrilamida 9% e as bandas foram reveladas com nitrato de prata. Estes mesmos produtos também foram aplicados em gel de agarose 1.4% e as bandas foram reveladas com brometo de etídio.

As marcas geradas pelos *primers* de ISSR foram julgadas como caracteres binários, presença (1) e ausência (0), e utilizadas para dois tipos de análises. Para a primeira, os dados foram empregados na construção de um dendograma, utilizando o coeficiente de Nei e Li (1979) e o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com o programa TREECON *for Windows* versão 1.3b. Nesta análise foram incluídas amostras de duas populações de *R. tenuis* (Terenos, MS e Tibagi, PR), de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* (Ivinhema, MS e Itararé, SP) e de *R. enmanuelis* (Tupã, SP e São Paulo, SP), uma amostra de população de *R. junciformis* (Anhanduí, MS), e uma amostra de população de *R. breviscula* H. Pfeiff. (Iporanga, SP), esta última pertencente a seção *Dichromena* sendo utilizada como grupo externo. Para a segunda análise, as bandas foram consideradas como locus 1 (presença), 0 (ausência) e B (locus polimórficos), e um dendograma foi construído empregando o método de parcimônia de Dollo, utilizando o programa Dollop presente no pacote Phylip 3.6.

## RESULTADOS

Os resultados mostraram sobreposições dos valores encontrados na maioria dos caracteres avaliados. As medidas obtidas das análises morfométricas encontram-se na Tabela 2. Os aquênios de *R. tenuis* foram os que mais variaram em tamanho, com alguns frutos medindo aproximadamente metade do tamanho daqueles das demais espécies (Figuras 1A-C). Além disso, *R. tenuis* apresentou aquênios redondo-obovados, enquanto que *R. tenuis*

subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* (Figuras 1D e E, respectivamente) apresentaram aquênios obovados. *Rhynchospora junciformis* apresentou aquênios arredondados a oblatos, com tamanhos muito próximos aos de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* (Figura 1F). Os estilopódios dessas espécies foram bastante similares, do tipo triangular-bilobado, exceto para os de *R. junciformis*, os quais apareceram mais compridos e volumosos, tipo triangular com a base algumas vezes levemente bilobada.

Todas as espécies analisadas apresentaram inflorescências do tipo corimbo, com pequenas variações nos números de corimbos axilares, em geral dois. Raramente foram observados três corimbos em *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. A distância entre os corimbos nos colmos, também apresentou sobreposições de valores entre as espécies. *Rhynchospora tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* apresentaram espiguetas geralmente em grupos de 4 a 7, enquanto que *R. junciformis* apresentou espiguetas geralmente em grupos de 2 ou solitárias nas pontas dos ramos. Todas as espécies apresentaram espiguetas curvadas quando maduras, porém, esta característica foi menos marcante em *R. tenuis*. Todos os indivíduos das quatro espécies estudadas apresentaram três estames. Contudo, em todas as amostras foram observadas variações no tamanho das anteras de uma mesma espiguetas (Figuras 1G-I). A presença de um pequeno estaminódio foi marcante e mais constante em *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* (Figura 1I).

A análise citogenética mostrou  $2n = 4$  para *R. tenuis* (Figura 2A) e  $2n = 18$  para *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. junciformis* e *R. enmanuelis* (Figuras 2B-D, respectivamente). *Rhynchospora tenuis* exibiu um cariótipo composto por dois cromossomos maiores e dois menores, com complemento total medindo aproximadamente  $21\mu\text{m}$  (Tabela 1). *Rhynchospora enmanuelis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. junciformis* apresentaram cariótipos bastante semelhantes, com cromossomos decrescendo suavemente em tamanho. O complemento total do lote diplóide dessas três espécies foi o dobro do observado em *R. tenuis* (Tabela 1). A análise meiótica realizada em *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* mostrou  $7^{\text{II}} + 1^{\text{IV}}$  (Figuras 2E-F) e, em pouquíssimas células, foram observados nove bivalentes.

A FISH com a sonda de DNAr 45S mostrou dois sinais de hibridização para *R. tenuis* com  $2n = 4$ , localizados nas regiões terminais dos dois cromossomos menores (Figuras 2G e J). Em *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis*, com  $2n = 18$ , foram observados seis sinais de hibridização, localizados também nas regiões terminais dos cromossomos (Figuras 2H-I e K-L). *Rhynchospora enmanuelis* apresentou cariótipo muito similar ao de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, com os sinais de DNAr 45S localizados nos mesmos cromossomos nas duas espécies. Contudo, *R. junciformis* apresentou

alguns sinais localizados em cromossomos diferentes dos de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* (Figura 2K-L).

Os oito *primers* de ISSR geraram fragmentos entre 350 a 1800 pb. Ao todo, foram considerados 116 locus polimórficos, após o teste de repetibilidade. *Rhynchospora tenuis* compartilhou poucas bandas com *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. Contudo, esta última espécie compartilhou muitas bandas com *R. enmanuelis* e *R. junciformis* (Figura 3). Os ramos formados pelo agrupamento UPGMA apresentaram nós com 69% a 100% de *bootstrap*. Este agrupamento separou claramente *R. breviuscula* (espécie pertencente à seção *Dichromena*) das demais espécies, com apenas 9% de similaridade. As espécies pertencentes a seção *Tenues* formaram dois grupos principais, com 39% de similaridade. O grupo A alocou as duas amostras de *R. tenuis*, as quais apresentaram 77% de similaridade. Em B foi agrupado *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis*. O grupo B pode ser dividido em dois subgrupos com 60% de similaridade. O primeiro grupo, denominado C, incluiu apenas *R. junciformis*. O grupo D agrupou *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* com 68% de similaridade. O grupo D ainda pode ser dividido em subgrupos, onde um incluiu uma amostra de população de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* (Itararé, SP) e outra de *R. enmanuelis* (São Paulo, SP) as quais chamaram a atenção por apresentarem 85% de similaridade (Figura 4).

O agrupamento obtido com a análise de parcimônia de Dollo foi bastante semelhante ao obtido com o método UPGMA. *Rhynchospora breviuscula* se mostrou separada das demais espécies da seção *Tenues*. *Rhynchospora tenuis* foi alocada separadamente de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*, as quais foram agrupadas em um mesmo ramo. Estas duas espécies apareceram mais próximas de *R. junciformis* do que de *R. tenuis* (Figura 5).

## DISCUSSÃO

As medidas morfológicas obtidas para *R. tenuis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, *R. enmanuelis* e *R. junciformis* exibiram sobreposições nos valores para todos os caracteres avaliados, exceto para o estilopódio de *R. junciformis*. Essa sobreposição também foi observada quando comparadas às medidas descritas na literatura (Barros 1960; Koyama 1972; Rocha e Luceño 2002; Strong 2006). Contudo, a forma dos aquênios e dos estilopódios, o número de espiguetas terminais, os números cromossômicos e a análise de marcadores

ISSR, quando observados conjuntamente, mostraram-se úteis para propor uma nova relação entre estes quatro táxons da seção *Tenues*.

*Rhynchospora junciformis* pode ser diferenciada das demais espécies pela presença de um número menor de espiguetas nas pontas dos ramos e pela diferença na morfologia dos aquênios e estilopódios, como já havia sido mencionado por Barros (1960), Rocha e Luceño (2002), Strong (2006). Nas amostras estudadas neste trabalho, o estilopódio foi triangular, algumas vezes levemente bilobado, alcançando até um terço do comprimento do aquênio, muito similar à morfologia do estilopódio de *R. junciformis* descrita por Barros (1960). Contudo, estas foram diferentes das descrições de Rocha e Luceño (2002) e Strong (2006), cujo estilopódio está reduzido a um apículo em *R. junciformis* var. *monocarpa* Kükenth. A análise citogenética mostrou que o cariótipo de *R. junciformis*, com  $2n = 18$  e seis sítios terminais de DNAr 45S, é muito similar ao de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. Embora no cariótipo de *R. junciformis* sinais foram localizados em cromossomos diferentes dos de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. O número cromossômico de *R. enmanuelis* já havia sido descrito por Vanzela et al. (2000). A similaridade entre *R. junciformis*, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis* também foi observada nas análises de marcadores ISSR, sugerindo que, apesar de *R. junciformis* ser muito bem circunscrita, ela está muito próxima de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*.

As amostras de *R. enmanuelis* apresentaram morfologia muito semelhante às de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, inclusive para os caracteres que Rocha e Luceño (2002) consideraram diagnósticos para delimitar *R. enmanuelis* como uma espécie nova, separada de *R. tenuis*. Para descrever *R. enmanuelis*, estes autores utilizaram medidas da largura das folhas, do comprimento dos colmos, das espiguetas e dos estilopódios, a presença de dois a três corimbos axilares e principalmente a presença de dois estames. Exceto pela ocorrência dos dois estames, as demais características foram descritas para *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* (Koyama 1972; Strong 2006). Os resultados mostraram que tanto *R. enmanuelis* quanto *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* apresentam três estames, assim como as demais espécies que compõem o complexo *Rhynchospora tenuis* (Strong 2006). Contudo, vale ressaltar que ambas, *R. enmanuelis* e *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, apresentaram um pequeno estaminódio em boa parte das espiguetas analisadas, o que pode ter levado alguns autores a diferentes circunscrições baseados na contagem de anteras. A presença de estaminódio não foi mencionada para as espécies do complexo *Rhynchospora tenuis* nas revisões de Barros (1960), Koyama (1972), Rocha e Luceño (2002) e Strong (2006). Os dados

citogenéticos, assim como os de marcadores ISSR, também mostraram uma grande semelhança entre *R. enmanuelis* e *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. Os dendogramas obtidos pelo método de UPGMA e Dollo agruparam essas duas espécies sempre em um mesmo ramo com, 68% a 85% de similaridade entre elas. O conjunto de dados obtidos com as análises morfológicas, citogenéticas e moleculares, mostraram que esses dois táxons provavelmente fazem parte de apenas uma entidade taxonômica. Assim sendo, o nome *Rhynchospora enmanuelis*, descrito recentemente por Rocha e Luceño (2002), pode ser uma sinonímia de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, a qual foi inicialmente descrita por Koyama (1972).

*Rhynchospora tenuis* apresentou morfologia muito similar à de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. Embora os aquênios dessas duas espécies sejam diferentes quanto a forma, grande parte das características utilizadas por Koyama (1972) para delimitar *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, como o tamanho das anteras, o comprimento e forma (curvadas quando maduras) das espiguetas e a distância entre os corimbos nos colmos, foram observadas em todas as amostras de *R. tenuis* e *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* estudadas neste trabalho. Todas as medidas morfológicas feitas para esses dois táxons apresentaram sobreposições de valores. Este conjunto de caracteres similares dificulta a separação dessas duas entidades em espécies distintas e explica o status de subespécie para *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. Contudo, os resultados obtidos pelos marcadores ISSR e a estrutura dos cariótipos se mostraram importantes para separar esses dois táxons. Os agrupamentos feitos pelos métodos UPGMA e Dollo colocaram *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* separada de *R. tenuis*, com uma similaridade de 39%. Interessantemente, a primeira espécie apresentou 60% de similaridade com *R. junciformis*. Desse modo, *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* com  $2n = 18$  parece ser mais próxima de *R. junciformis*, também com  $2n = 18$ , do que de *R. tenuis* com  $2n = 4$ . O número cromossômico  $2n = 4$  encontrado em *R. tenuis* já havia sido descrito por Vanzela et al. (1996), assim como o número e a localização dos sítios de DNAr 45S (Vanzela et al. 2003). Não foram encontrados números cromossômicos intermediários entre *R. tenuis* e *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, mesmo em situação de simpatria. Estes fatos sugerem que, mesmo que essas espécies tivessem feito parte de uma mesma entidade taxonômica, elas já passaram por um processo de diferenciação cariotípica tendo como barreira reprodutiva os diferentes números cromossômicos encontrados ( $n = 2$  e  $n = 9$ ). Esta condição parece ser suficiente para sugerir a elevação de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* para o status de espécie: *Rhynchospora austro-brasiliensis*.

As medidas de tamanho do complemento total dos cariótipos de *R. tenuis* e *R. austro-brasiliensis*, aliadas a presença de sete bivalentes e um tetravalente nas análises meióticas feitas em *R. austro-brasiliensis* sugerem que a origem do número cromossômico  $2n = 18$  esteja envolvida com evento de poliploidia associado a disploidia. Dessa forma  $n = 5$  poderia ter passado por um evento de poliploidia dando origem a  $n = 10$ , o qual teria passado por um evento de simpliploidia dando origem a  $n = 9$ , como observado no cariótipo de *R. austro-brasiliensis*. Tais explicações parecem ser razoáveis, se considerarmos o número básico  $x = 5$  para a família (Löve et al. 1957) e a existência de espécies com cariótipos com  $2n = 10$  na seção *Tenuis*, como *R. nanuzae*, *R. riparia* e *R. emaciata* (Vanzela et al. 2000).

O uso conjunto de análises morfológicas, citogenéticas e de genética molecular gerou resultados que apontaram para um novo caminho em direção à resolução de problemas taxonômicos relacionados à seção *Tenuis*. Esses resultados indicaram a necessidade de uma reavaliação do status de algumas espécies, sobretudo no que diz respeito à elevação de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* ao nível de espécie: *R. austro-brasiliensis*, e a inclusão de *R. enmanuelis* como sinônimo de *R. austro-brasiliensis*.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária e ao CNPq pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Alves M, Araújo AC, Prata AP, Vitta F, Hefler S, Trevisan R, Bragança AS, Martins GS, Thomas W (2009) Diversity of Cyperaceae in Brazil. *Rodriguésia* 60: 771-782.
- Barros M (1960) Las Cyperaceas del Estado de Santa Catalina. *Sellowia* 12: 321-369.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2005) Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Bot J Linn Soc* 149: 457-464.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2008a) Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenet Genome Res* 122: 175-180.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Rego LNAA, Torezan JMD, Vanzela ALL (2008b) Cytogenetical and cytotaxonomical analysis of some Brazilian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Aust J Bot* 56: 82-90.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res* 7: 1869-1885.
- Guerra MS, Brasileiro-Vidal AC, Arana P, Puertas MJ (2005) Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylations in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genética* 126: 1-9.
- Koyama T (1972) Cyperaceae-Rhynchosporae and Cladieae. *Mem New York Botan G* 23: 23-89.
- Kükenthal G (1951) Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora*. *Bot Jahrb Syst* 75: 273-314.
- Löve A, Löve D, Raymond M (1957) Cytotaxonomic of *Carex* section Cappilares. *Can J Botany* 35: 715-761.
- Luceño M, Castroviejo S (1991) Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion e fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Syst Evol* 177: 149-159.
- Luceño M, Vanzela ALL, Guerra M (1998) Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can J Botany* 76: 440-449.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5269-5273.
- Ohkawa T, Yokota M, Hoshino T (2000) Aneuploidal population differentiation in *Carex sociata* Boott (Cyperaceae) of the Ryukyu Islands, Japan. *Bot J Linn Soc* 132: 337-358.

- Rocha EA, Luceño M (2002) Estudo taxonômico de *Rhynchospora* Vahl seção *Tenuis* (Cyperaceae) no Brasil. *Hoehnea* 29: 189-214.
- Strong MT (2006) Taxonomy and Distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America. *Contr U S Natl Herb* 53: 1-225.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceño M (1996) *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes. *Cytobios* 88: 219-228.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M (2000) Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot J Linn Soc* 134: 557-566.
- Vanzela ALL, Colaço W (2002) Mitotic and meiotic behavior of gama irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Sc* 24: 611-614.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M (2003) Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 26: 199-201.

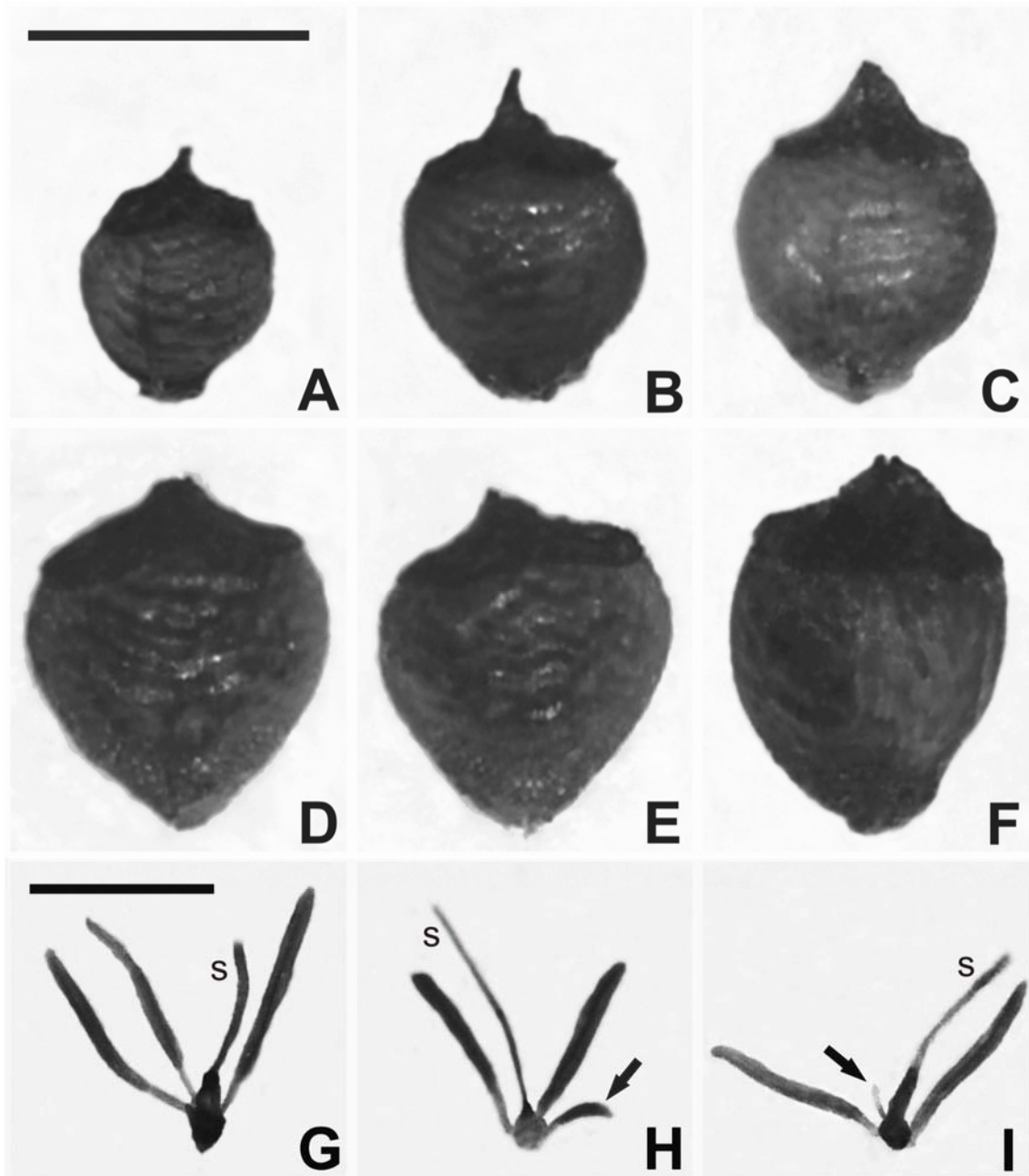
**Tabela 1** – Dados cromossômicos das espécies analisadas e seus respectivos locais de coleta.

Espécies	2n	CT ( $\mu\text{m}$ )	CM e Cm ( $\mu\text{m}$ )	Localidades
<i>Rhynchospora tenuis</i> Link.	4	20,98	6,75 - 3,73	S 24° 34' 50" - W 50° 15' 03", Tibagi, PR
				S 24° 07' 23" - W 49° 23' 46", Itararé, SP
				S 20° 33' 25" - W 54° 47' 45", Terenos, MS
<i>R. tenuis</i> subsp. <i>austro-brasiliensis</i> T. Koyama	18	45,66	3,16 - 1,78	S 25° 28' 15" - W 49° 40' 48", Campo Largo, PR
				S 24° 07' 23" - W 49° 23' 46", Itararé, SP
				S 24° 21' 58" - W 49° 02' 69", Palmitalzinho, SP
				S 25° 17' 02" - W 49° 54' 04", Tibagi, PR
				S 22° 21' 47" - W 53° 30' 54", Ivinhema, MS
<i>R. enmanuelis</i> Luceño & Rocha	18	46,21	3,22 - 1,74	S 21° 51' 47" - W 50° 32' 81", Tupã, SP
				S 23° 33' 41" - W 46° 43' 25", São Paulo, SP
<i>R. junciformis</i> (Kunth) Böckeler	18	46,37	3,47 - 1,81	S 21° 12' 25" - W 54° 30' 03", Anhanduí, MS

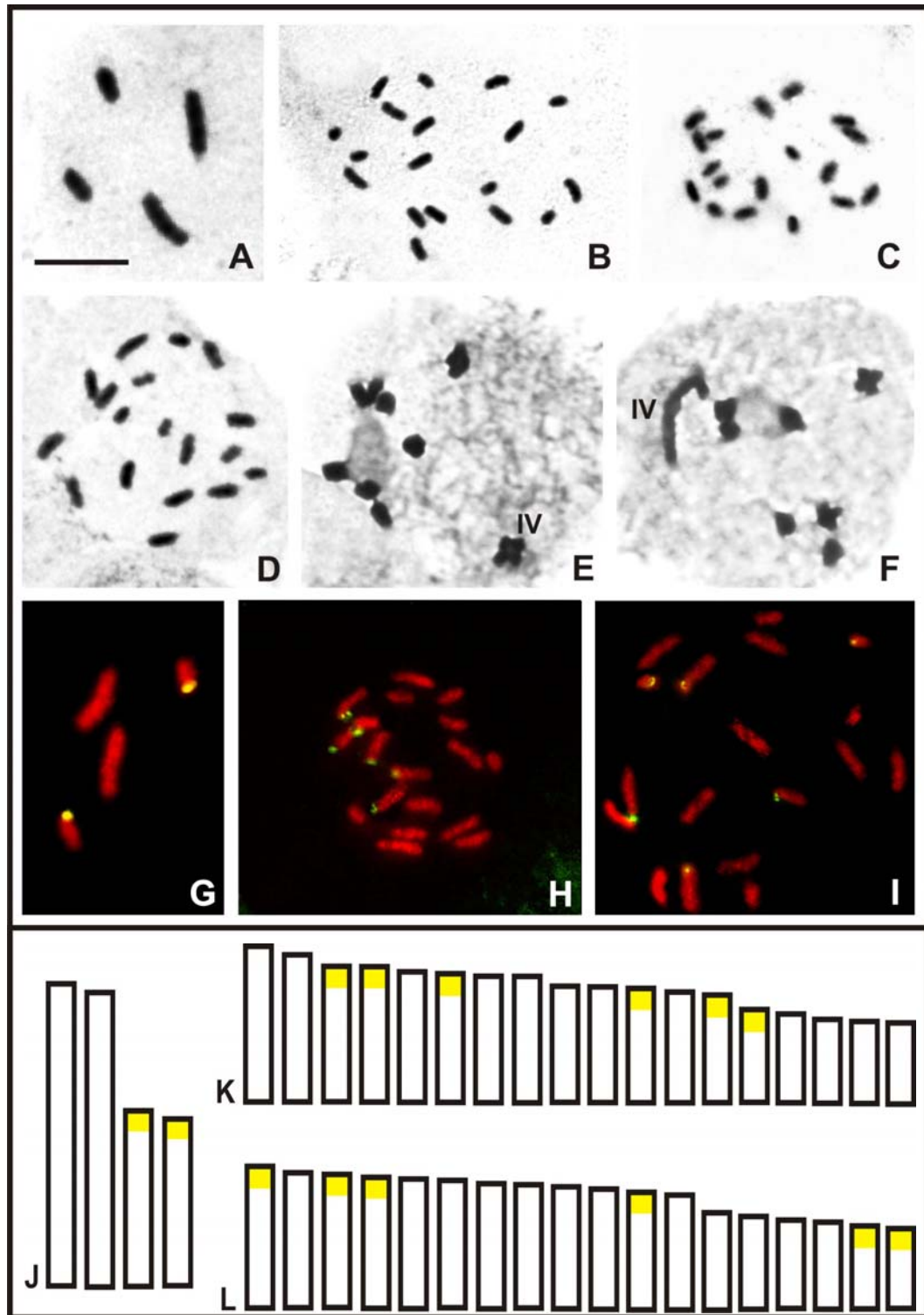
CT = comprimento total do cariótipo; CM = comprimento do maior cromossomo e Cm = comprimento do menor cromossomo.

**Tabela 2** – Características morfológicas das espécies analisadas.

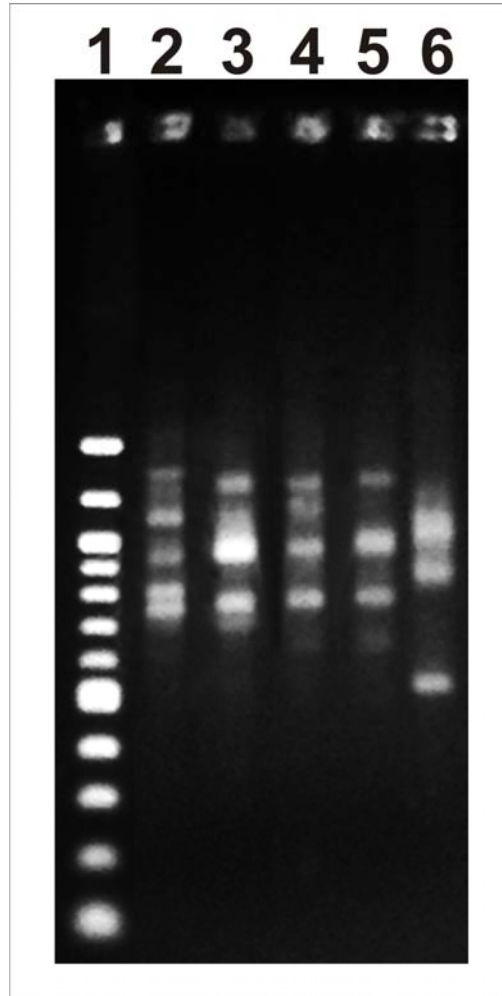
Características	Espécies			
	<i>R. tenuis</i>	<i>R. tenuis</i> subsp. <i>austro-brasiliensis</i>	<i>R. enmanuelis</i>	<i>R. junciformis</i>
Planta (comprimento)	17 - 38 cm	16 - 40 cm	26 - 36,5 cm	24 - 41 cm
Folha (largura)	0,6 - 1,45 mm	0,6 - 1,50 mm	0,6 - 1,1 mm	1,0 - 1,5 mm
Hábito de crescimento	cespitoso	cespitoso	cespitoso	cespitoso
Inflorescência (comprimento)	9,0 - 12,0 cm	7,5 - 14,5 cm	8,5 - 12,8 cm	9,0 - 14
Inflorescência (largura)	3,25 - 4,55 cm	2,75 - 6,0 cm	3,5 - 4,2 cm	2,8 - 5,6
Corimbos axilares (número)	2	2 - 3	2 - 3	2
Espigueta (comprimento)	3,3 - 4,1 mm	3,3 - 4,25 mm	3,4 - 4,1 mm	3,4 - 4,25 mm
Espigueta (largura)	0,85 - 1,1 mm	0,7 - 1,0 mm	0,65 - 1,0 mm	0,83 - 1,1 mm
Espiguetas nas pontas dos ramos (número)	4 a 7	4 a 7	4 a 7	1 a 2
Estames (número)	3	3	3	3
Aquênio (comprimento)	0,69 - 0,99 mm	1,03 - 1,14 mm	1,0 - 1,15 mm	1,07 - 1,20 mm
Aquênio (largura)	0,66 - 0,94 mm	1,05 - 1,09 mm	0,94 - 1,08 mm	0,92 - 0,99 mm
Aquênio (forma)	redondo-obovado	obovados	obovados	arredondado para oblato
Aquênio (coloração)	castanho amarelado	castanho amarelado	castanho amarelado	castanho amarelado
Estilopódio (comprimento)	0,22 - 0,25 mm	0,22 - 0,26 mm	0,25 - 0,27 mm	0,38 - 0,43 mm
Estilopódio (largura)	0,50 - 0,72 mm	0,87 - 0,92 mm	0,82 - 0,89 mm	0,87 - 0,91 mm
Estilopódio (forma)	triangular bilobado	triangular bilobado	triangular bilobado	triangular



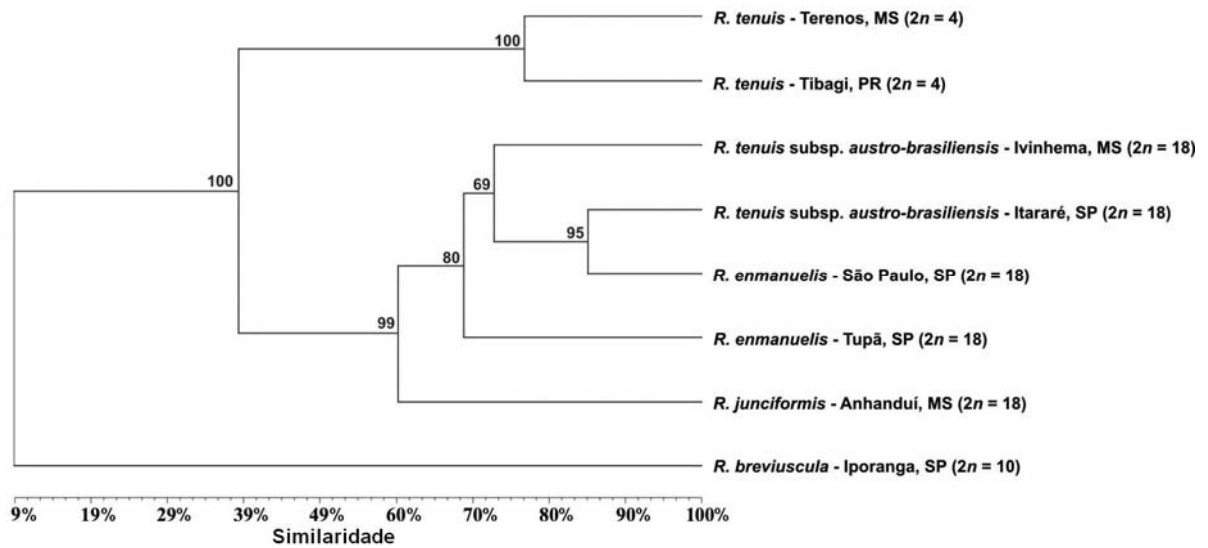
**Figura 1** – Imagens de caracteres morfológicos das espécies estudadas. **A-F)** Aquênios de **A-C)** *Rhynchospora tenuis*, observe a variação no tamanho dos frutos dentro da espécie e, a diferença na forma dos aquênios em relação a **D)** *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e **E)** *R. enmanuelis*, observe também a semelhança nos frutos destes dois últimos táxons; **F)** *R. junciformis*, observe a diferença na forma do aquênio e no comprimento e forma do estilopódio em relação as demais espécies. **G-I)** Anteras de *R. enmanuelis* **G)** Três anteras praticamente com o mesmo tamanho; **H)** Duas anteras maiores e uma menor indicada pela seta; **I)** Duas anteras maiores e um pequeno estaminódio indicado pela seta. S = estilete. Barra = 1 mm.



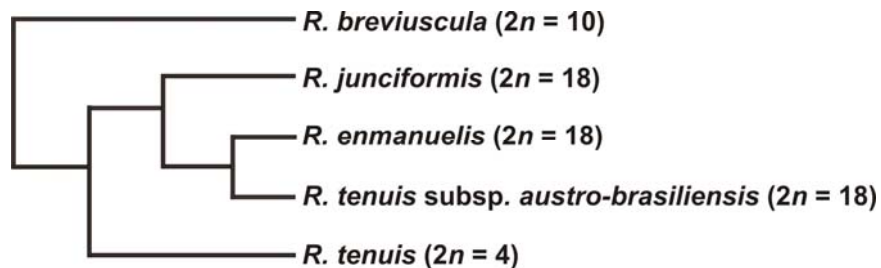
**Figura 2** – Imagens das análises cromossômicas. **A-D)** Metáfases mitóticas de **A)** *R. tenuis* com  $2n = 4$ , **B)** *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, **C)** *R. junciformis* e **D)** *R. enmanuelis*, todas com  $2n = 18$ ; **E-F)** Metáfases meióticas de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* apresentando sete bivalentes e um tetravalente; **G-I)** Metáfases mitóticas evidenciando os sinais de DNAr 45S (amarelo) em **G)** *R. tenuis* **H)** *R. junciformis* e **I)** *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . **J-L)** Idiograma representando a localização dos sinais de DNAr 45S (amarelo) nos cromossomos de **J)** *R. tenuis* **K)** *R. junciformis* e **L)** *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*.



**Figura 3** – Imagem de gel de agarose evidenciando as bandas geradas pela reação de PCR com o *primer* de ISSR GA<sub>9</sub>+C. As espécies estão apresentadas na seguinte sequência: poço **2**) *R. tenuis*, **3**) *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, **4**) *R. enmanuelis*, **5**) *R. junciformis* e **6**) *R. breviscula*. Observe a diferença nas bandas obtidas para *R. tenuis* quando comparadas as de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*. Observe também, a semelhança das bandas encontradas para essas duas últimas espécies com as de *R. junciformis*. O poço **1**) apresenta o marcador de 100 pb.



**Figura 4** – Dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA e no coeficiente de Nei e Li (1979). Observe as populações de *Rhynchospora tenuis* alocadas separadamente das de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis*, e estas últimas, agrupadas com as populações de *R. enmanuelis*. Os números nos nós representam os valores de *bootstrap*.



**Figura 5** – Dendrograma baseado no método de parcimônia de Dollo. Observe *Rhynchospora tenuis* alocada separadamente de *R. tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* e *R. enmanuelis*, e estas duas últimas alocadas próximas a *R. junciformis*.

## CONCLUSÕES

- *Rhynchospora tenuis* subsp. *austro-brasiliensis* esta separada de *R. tenuis*, devendo a primeira ser elevada ao nível de espécie: *Rhynchospora austro-brasiliensis*;
- O nome *R. enmanuelis* deve ser considerado uma sinonímia de *R. austro-brasiliensis*;
- O cariótipo com  $2n = 18$  encontrado em *Rhynchospora austro-brasiliensis* teve sua origem provavelmente a partir de um cariótipo com  $2n = 10$  o qual passou por eventos de poliploidia e disploidia;
- *Rhynchospora junciformis* e *R. austro-brasiliensis* estão mais próximas entre si do que de *R. tenuis*;
- Variações cromossômicas numéricas originadas por poliploidia e disploidia parecem ser comuns na seção *Tenuis*.