



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCAS JOHNEN

**ORIGEM E VIGOR ADAPTATIVO DE ALOPOLIPLOIDES EM  
CYPERACEAE:**

UM ESTUDO DE CASO NO COMPLEXO *Eleocharis montana*

---

Londrina  
2018

LUCAS JOHNEN

**ORIGEM E VIGOR ADAPTATIVO DE ALOPOLIPLOIDES EM  
CYPERACEAE:**

UM ESTUDO DE CASO NO COMPLEXO *Eleocharis montana*

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

Orientador: Dr. André Luís Laforga Vanzela

Londrina  
2018

Johnen, Lucas.

Origem e vigor adaptativo de aloploiploides em Cyperaceae : um estudo de caso no complexo *Eleocharis montana* / Lucas Johnen. - Londrina, 2018. 67 f. : il.

Orientador: André Luís Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Biosistemática - Tese. 2. híbridos - Tese. 3. poliploides - Tese. I. Vanzela, AndréLuís Laforga . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III.Título

LUCAS JOHNEN

**ORIGEM E VIGOR ADAPTATIVO DE ALOPOLIPLOIDES EM  
CYPERACEAE:**

UM ESTUDO DE CASO NO COMPLEXO *Eleocharis montana*

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dr.<sup>a</sup> M. Socorro González-Elizondo  
Instituto Politécnico Nacional – IPN/México

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de julho de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

A Carol por tudo que construímos juntos e pela melhor companhia, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram e ajudaram durante toda minha formação até aqui, sempre me ouvindo e aconselhando.

Ao André Vanzela pela orientação, conversas, cervejas e conselhos aplicados a carreira acadêmica, mas também pelos que serão levados para vida toda.

Aos companheiros e companheiras de laboratório, que por muitas vezes abriram mão de seus próprios afazeres para me ajudar.

Aos amigos (não vou citar todos por motivos de esquecimento) pelo incentivo para a realização deste trabalho, assim como parceria em todos os momentos.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Programa de Genética e Biologia Molecular, e ao CNPq pelo apoio financeiro.

JOHNEN, Lucas. **Origem e vigor adaptativo de alopoliploides em Cyperaceae: um estudo de caso no complexo *Eleocharis montana***. 2018. 65f. Dissertação (Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

## RESUMO

A alopoliploidia é um tipo de rearranjo cromossômico caracterizado por eventos de hibridização seguidos de poliploidizações e pode ser percebida na natureza pela ocorrência de espécies com números cromossômicos elevados, diferentes níveis de ploidia e populações amplamente adaptadas, em relação aos parentais. O gênero *Eleocharis* (Cyperaceae) espécies com cromossomos holocêntricos, possui vários registros de disploidia e poliploidia e casos de hibridização, além de uma filogenia com grupos parafiléticos ou completamente artificiais, que levam a incertezas sobre a história evolutiva. A morfologia do gênero é marcada por caracteres plesiomórficos, estruturas florais com tamanhos reduzidos e por pequenas variações no tamanho de estruturas como colmos e aquênios. O objetivo desse estudo foi caracterizar de maneira comparativa os representantes do continente sul-americano do complexo *E. montana* sob o ponto de vista evolutivo, relacionando morfologia, anatomia, diversidade genômica e cariotípica e distribuição geográfica. A morfo-anatomia associada a morfometria mostrou um possível processo de hibridização natural no complexo *E. montana*, devido a sobreposição de características entre *E. contracta*, *E. elegans* e *E. montana*, comparativamente à *E. parodii* e *E. subarticulata*. Pelo menos para *E. contracta* e *E. montana*, não houve diferenças claras capazes de diferenciá-las, e o mesmo aconteceu entre as diferentes populações analisadas de *E. montana*. A comparação dos valores C de DNA indica que as variações nos tamanhos dos genomas se dão principalmente pela poliploidia, como anteriormente reportado para o gênero, sendo os disploides pouco importantes para tais diferenças. A filogenia do grupo baseada no DNAr divergiu das demais análises, já que aproximou *E. elegans* de *E. parodii* e *E. subarticulata*, em relação a *E. contracta* e *E. montana*, contudo, o mesmo não ocorreu na análise de marcadores moleculares. Essa análise separou todas as espécies, deixando *E. elegans* um pouco mais próxima de *E. contracta* e *E. montana*. A hibridização genômica *in situ* confirmou a formação de híbridos tetraploides (*E. elegans* e *E. contracta*), tendo como um dos genomas parentais para ambas *E. parodii* e sustentou um ciclo a mais de poliploidia na formação de *E. montana* a partir de *E. contracta*. Nossos resultados mostraram que o Sul da América do Sul é o centro de dispersão e provável zona de hibridização do complexo *E. montana*. Dentre os poliploides *E. elegans* (tetraploide) e *E. montana* (octaploide) tiveram sucesso na irradiação até as Américas Central e do Norte, enquanto que *E. contracta* manteve-se na zona híbrida em um número reduzido de populações, similarmente aos diploide e disploide.

**Palavras chave:** Biosistemática. Citometria de fluxo. Disploides. GISH. Híbridos. Marcadores moleculares. Poliploides.

JOHNEN, Lucas. **Origin and adaptative vigor of allopolyploids in Cyperaceae: a case study of *E. montana* complex.** 2018. 65p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, Londrina. 2018.

## ABSTRACT

Allopolyploidy is a type of chromosomic arrangement known by hybridization events followed by polyploidization and may be perceived in nature by the occurrence of high chromosome counts, different ploidy levels and broadly adapted species in comparison to parentals. The genus *Eleocharis* (Cyperaceae) present species with holocentric cromossomic and several records of disploidy, polyploidy and hybridization, in addition to phylogenetic relationships with paraphyletic and artificial groups, which leads to uncertainties in the evolution historic of the group. The morphology of the genera is marked by plesiomorphic features such as reduced floral components with little variations in size of culms and achenes. The goal of this study was to characterize in a comparative way the south American individuals of *Eleocharis montana* complex using an evolutionary approach, relating morphology, anatomy, genomic and karyotypic diversity and geographic distribution. Morphology and anatomy analysis associated to morphometrics showed a possible natural hybridization process in *E. montana* complex due to overlapping features between *E. contracta*, *E. elegans* and *E. montana* in relation to *E. parodii* and *E. subarticulata*. At least in *E. contracta* and *E. montana*, no clear differences were capable to distinguish them, and the same happened to different populations of *E. montana*. DNA C value comparations indicate that variations in genome size are mainly due to polyploidy, as was reported earlier for the genera, with disploidy events being less important for such differences. Phylogeny based on rDNA diverged from the other analysis, as it approximated *E. elegans* to *E. parodii* and *E. subarticulata* in relation to *E. contracta* and *E. montana*. However, the same did not happen in molecular markers analysis, which separated all species, leaving *E. elegans* closer to *E. contracta* and *E. montana*. Genomic *in situ* hybridization confirmed the formation of tetraploid hybrids (*E. elegans* and *E. contracta*), with *E. parodii* as the parental genome for both with another cycle of polyploidy in *E. montana* and *E. contracta* formation. These results showed south of South America as the dispersion center and probable hybridization zone of *E. montana* complex. Among the polyploids, *E. elegans* (tetraploid) and *E. montana* (octaploid) achieved irradiative success as far as Central and North America, while *E. contracta* stayed in the hybrid zone in a reduced population number, similarly to the diploids and disploids.

**Keywords:** Biosystematics. Flow citometry. Disploids. GISH. Hybrids. Molecular markers. Polyploids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Imagens ilustrando a variação de inflorescências em Cyperaceae: A - *Dulichium arundinaceum* (panícula), B - *Cyperus haspan* (panícula), C - *Rhynchospora latifolia* (capítulo), D - *Eriophorum latifolium* (capítulo), E- *Carex capitata* (espigueta) e F - *Cyperus capitatus* (capítulo). Adaptado de Vrijdaghs et al. (2010)..... 3
- Figura 2** - Filogenia simplificada de Cyperaceae. Vrijdaghs et al., 2010, adaptado de Muasya et al. (2009)..... 4
- Figura 3** - Posicionamento das espécies do complexo *E. montana* na filogenia do gênero *Eleocharis*, baseada em marcadores genéticos e morfológicos. Adaptado de Roalson et al. (2010)..... 6
- Figura 4** - Micromorfologia da superfície do aquênio com microscopia eletrônica de varredura. A - *E. plicarhachis*; B - *E. obtuserigona*; C - *E. squamigera*; D - *E. obtuserigona*; E - *E. montana*; F - *E. montevidensis*; G - *E. contracta*; H - *E. parodii*. Adaptado de Da Silva et al. (2011) ..... 7
- Figura 5** - Metáfases mitóticas coradas com Giemsa, mostrando a diversidade no número cromossômico. A - *E. subarticulata*; B - *E. elegans*, adaptados de Da Silva et al., (2010a); C - *E. montana* e D - *E. contracta*, adaptadas de Souza et al. (2018) 8
- ### ARTIGO
- Figura 1** - Localização geográfica das populações coletadas e identificadas de *E. contracta*, *E. montana*, *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii*. Algumas populações próximas de *E. montana* estão representadas por um único ponto de referência no mapa, o asterisco (\*) representa esses locais com mais de uma população..... 16
- Figura 2** - Morfologia das espécies sul-americanas do complexo *E. montana*, com detalhe nas principais características diagnósticas, baseado em Trevisan (2005 e 2009) ..... 22

<b>Figura 3 -</b>	Diferenciação do contorno do aquênio de <i>E. contracta</i> , <i>E. montana</i> , <i>E. elegans</i> , <i>E. subarticulata</i> e <i>E. parodii</i> , estimada no programa LeafAnalyser 2.3.0 com 48 landmarks.....	24
<b>Figura 4 -</b>	Imagens demonstrando a variação fenotípica de <i>E. montana</i> , com detalhes nas estruturas: espiguetas A, B, C, D e E; colmo - F, G, H, I, J; bainha/mucrão - K, L, M, N, O; aquênio - P, Q, R, S, T; e gluma - U, V, W, X e Z. Note que a principal variação foi no tamanho, com destaque para as inflorescências. Note também a irregularidade na disposição dos septos .....	26
<b>Figura 5 -</b>	Anatomia do colmo de <i>E. montana</i> , <i>E. contracta</i> , <i>E. elegans</i> e <i>E. subarticulata</i> corados com azul de toluidina 0,05% .....	28
<b>Figura 6 -</b>	Comparação do conteúdo de DNA das espécies do continente sul-americano do complexo <i>E. montana</i> com o valor médio das espécies diploides de <i>Eleocharis</i> . Correlação entre número cromossômico e a quantidade de DNA total para <i>E. subarticulata</i> , <i>E. elegans</i> , <i>E. contracta</i> e <i>E. montana</i> , com valores de DNA total de células somáticas (2C) e quantidade de DNA do complemento monoploide (Cx) em pictogramas .....	29
<b>Figura 7 -</b>	Metáfases e prometáfases mitóticas coradas com Giemsa, mostrando variação no número cromossômico das espécies sul-americanas do complexo <i>E. montana</i> . (A) <i>E. subarticulata</i> $2n = 2x = 6$ ; (B) <i>E. parodii</i> $2n = 4x = 20$ ; (C) <i>E. contracta</i> com $2n = 4x = 20$ ; (D) <i>E. elegans</i> com $2n = 4x = 20$ e (E) <i>E. montana</i> com $2n = 8x = 40$ . Barra = 5 $\mu$ m .....	30
<b>Figura 8 -</b>	Varredura de microssatélites <i>in silico</i> a partir de um sequenciamento de baixa cobertura de <i>E. elegans</i> , para a busca foi utilizado o programa SSRIT 2.3.0. (A) Conjunto de microssatélites que apresentaram mais repetições. (B) Proporção entre microssatélites com dois, três, quatro, cinco e seis pares de bases. (C) Porcentagem entre dos dez microssatélites mais frequentes na busca.....	31
<b>Figura 9 -</b>	Análise dos perfis de bandas dos marcadores ISSR, REMAP-Cópia e REMAP-Gypsy feitos a partir de amplificação por PCR, checados por	

	eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio. As barras (Em, Ee, Ec e Es) representam: <i>E. montana</i> , <i>E. Elegans</i> , <i>E. contracta</i> e <i>E. Subarticulata</i> , respectivamente. Os asteriscos (*) em branco correspondem às amostras que não foram utilizadas para as análises .....	32
<b>Figura 10 -</b>	Dendograma de quatro espécies do complexo <i>E. montana</i> baseado em marcador do tipo REMAP e ISSR.....	33
<b>Figura 11 -</b>	A - Alinhamento das sequências de DNAr 5.8S + ITS das espécies sul-americanas do complexo <i>E. montana</i> . B - Filogenia a partir de sequências de DNAr 5.8S + ITS por análise de Máxima Verossimilhança. Os valores entre parênteses representam as análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança .....	35
<b>Figura 12 -</b>	Hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH) usando cromossomos mitóticos, com cromossomos corados com DAPI (azul), FITC (verde) e pseudo-coloração do DAPI em vermelho. (A, B e C) GISH utilizando sonda de <i>E. parodii</i> em cromossomos de <i>E. elegans</i> ; (D, E e F) GISH utilizando sonda de <i>E. parodii</i> em cromossomos de <i>E. contracta</i> ; (G, H e I) GISH utilizando sonda de <i>E. parodii</i> em cromossomos de <i>E. montana</i> e (J, K e L) GISH utilizando sonda de <i>E. contracta</i> em cromossomos de <i>E. montana</i> .....	36
<b>Figura 13 -</b>	Hibridização <i>in situ</i> genômica (GISH) usando cromossomos mitóticos, com cromossomos corados com DAPI (azul), FITC (verde) e pseudo-coloração do DAPI em vermelho. (A, B e C) GISH utilizando sonda de <i>E. elegans</i> em cromossomos de <i>E. contracta</i> ; (D, E e F) GISH utilizando sonda de <i>E. montana</i> em cromossomos de <i>E. elegans</i> ; (G, H e I) GISH utilizando sonda de <i>E. elegans</i> em cromossomos de <i>E. contracta</i> e (J, K e L) GISH utilizando sonda de <i>E. montana</i> em cromossomos de <i>E. elegans</i> .....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Lista das espécies e populações coletados em campo.....	16
<b>Tabela 2 -</b>	Medições morfológicas das estruturas diagnósticas de <i>E. Montana</i> .....	27
<b>Tabela 3 -</b>	Análise de variância molecular (AMOVA) para quatro espécies do complexo <i>E. montana</i> usando ISSR e REMAP .....	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1	<b>Cyperaceae</b> .....	<b>3</b>
2.2	<b>Gênero <i>Eleocharis</i> e a subsérie <i>Truncatae</i> de <i>Eleocharis</i></b> .....	<b>5</b>
2.3	<b>Citogenômica e citotaxonomia</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
3.1	<b>Geral</b> .....	<b>12</b>
3.2	<b>Específicos</b> .....	<b>12</b>
3.2.1	Comparar cinco espécies do complexo <i>E. montana</i> com base em caracteres morfológicos e anatômicos .....	<b>12</b>
3.2.2	Comparar as características macro- e micro-morfológicas diagnósticas de <i>E. montana</i> e <i>E. contracta</i> e, assim, encontrar parâmetros de delimitação e sobreposição das duas espécies.....	<b>12</b>
3.2.3	Comparar a estrutura genômica das espécies do complexo <i>E. montana</i> com base no conteúdo de DNA nuclear, estruturação dos cariótipos, marcadores genéticos – ISSR e REMAP e filogenia.....	<b>12</b>
3.2.4	Comparar possíveis genomas híbridos por GISH, relacionar com a distribuição geográfica, definir o centro de diversidade e o perfil de irradiação das espécies desse complexo.....	<b>12</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>13</b>
	<b>ARTIGO</b> .....	<b>18</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>

<b>RESULTADOS</b> .....	26
<b>DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Eleocharis* (Cyperaceae) apresenta caracteres morfológicos plesiomórficos, com estruturas florais de tamanhos reduzidos, mas com pequenas variações no tamanho das estruturas, como colmos e aquênios (Simpson, 1988; Ueno et al., 1989; Menapace, 1991; González-Elizondo e Tena-Flores, 2000; Trevisan, 2009). Estudos filogenéticos no subgênero *Eleocharis* demonstraram agrupamentos parafiléticos ou completamente artificiais (Roalson e Friar, 2000; Roalson e Hinchliff, 2007; Roalson et al., 2010), sem uma clara elucidação da história evolutiva. Algumas espécies sul-americanas desse subgênero têm a circunscrição bem estabelecida, como *E. parodii*, *E. elegans* e *E. subarticulata*, enquanto outras, como *E. montana* e *E. contracta*, parecem manter sobreposição de caracteres diagnósticos. Tais sobreposições podem confundir ou levar a interpretações errôneas para a delimitação de espécies, a depender do conceito de espécie empregado, por exemplo: biológico, ecológico, evolucionista, filogenético, entre outros. Além disso, o aprofundamento das análises morfológicas, associado às análises moleculares e citogenômicas, podem ajudar a esclarecer sobre a origem de poliploides, híbridos e suas distribuições em diferentes paisagens e, com isso, compreender os processos de diferenciação, especiação e adaptação em habitats contrastantes.

Outras características como o tamanho dos genomas, estrutura cariotípica e marcadores moleculares podem ser de grande utilidade em interpretações evolutivas e biosistemáticas. Estudos reportam que poliploides, disploides e híbridos são comuns em *Eleocharis* (Roalson, 2008; Da Silva et al., 2005, 2008, 2010a, 2010b; Yano et al., 2016; Souza et al., 2018), com evidências de plasticidade fenotípica e sobreposição de caracteres diagnósticos. Esses são fatores que contribuem para as dificuldades de delimitação e diferenciação entre espécies relacionadas e populações. Esse é exatamente o caso do clado conhecido como complexo *Eleocharis montana*, com o total de nove espécies, mas com apenas cinco na América do Sul (*E. parodii*, *E. subarticulata*, *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*). Esse clado tem espécies morfológicamente muito semelhantes (*E. contracta* e *E. montana*), com algumas poliploides (*E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*), disploides com redução cromossômica (*E. subarticulata*), uma diploide (*E. parodii*) e outras espécies desconhecidas do ponto de vista citogenético e genômico. Tais informações mostram que há potencial para um estudo evolutivo comparativo sobre a origem, as relações genômicas e a diversidade das espécies nativas da América do Sul nesse grupo de monocotiledôneas. Diante disso, algumas questões foram levantadas: i) Como ocorreu as relações

entre diversidade genética, tamanho de genomas, hibridização e níveis de ploidia entre as espécies do complexo *E. montana*? ii) Quais os principais mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação cariotípica nesse complexo? iii) As diversidades morfológica e anatômica têm relação com a diversidade genômica? iv) Qual a origem dos poliploides? v) Há padrões que podem relacionar diversidade morfológica, distribuição geográfica e processos de hibridização no complexo? vi) Onde é o centro de diversidade e como se deu a irradiação das espécies que ocorrem na América do Sul?

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Cyperaceae

Cyperaceae é a terceira maior família de monocotiledôneas, compreendendo 104 gêneros e mais de 5.000 espécies (Goetghebeur, 1998; Govaerts et al., 2015). Há no Brasil aproximadamente 670 espécies, agrupadas em 35 gêneros (Alves et al., 2015). Seus representantes têm distribuição cosmopolita e são frequentemente encontrados em ambientes encharcados. O conjunto de características morfológicas que distinguem Cyperaceae das demais monocotiledôneas são: i) caules geralmente triangulares em seção transversal, ii) bainha fechada, iii) folhas com corpos silicosos cônicos e iv) fruto do tipo aquênio. As flores possuem tamanho reduzido, com pouca variação dentro do grupo, pois são compostas por bráctea, ramo, androceu, gineceu e cerdas periânticas. Contudo, a estrutura das inflorescências e dos aquênios são caracteres morfológicos importantes para a determinação das relações taxonômicas (Fig. 1) (Judd, 2009; Muaysa et al., 2009).

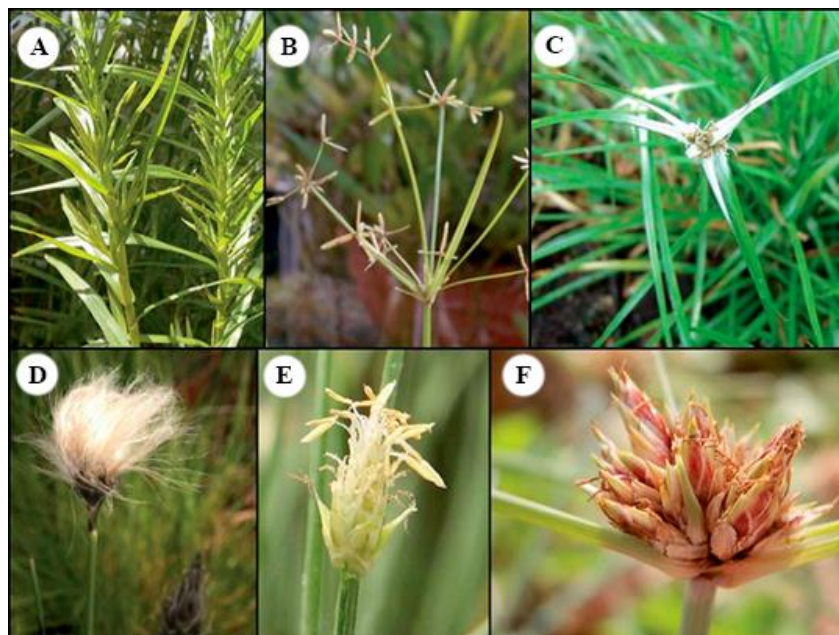


Figura 2. Variação de inflorescências em Cyperaceae: A - *Dulichium arundinaceum* (panícula), B - *Cyperus haspan* (panícula), C - *Rhynchospora latifolia* (capítulo), D - *Eriophorum latifolium* (capítulo), E- *Carex capitata* (espigueta) e F - *Cyperus capitatus* (capítulo). Adaptado de Vrijdaghs et al. (2010).

A família é dividida em duas subfamílias (Cyperoideae e Mapanoideae) e 14 tribos, com base em dados de filogenias moleculares e morfológicas (Fig. 2) (Simpson et al., 2003, 2007; Muasya et al., 2009; Semmouri et al., 2018). As duas subfamílias podem ser facilmente diferenciadas pela estrutura das flores e inflorescências. Em Cyperoideae, as espiguetas têm flores hermafroditas, onde cada flor está entre o ramo e uma bráctea ou gluma. Em contraste, as Mapanoideae têm inflorescências com uma flor pistilada terminal, e flores estaminadas laterais (Haines e Lye, 1983; Goetghebeur, 1998).

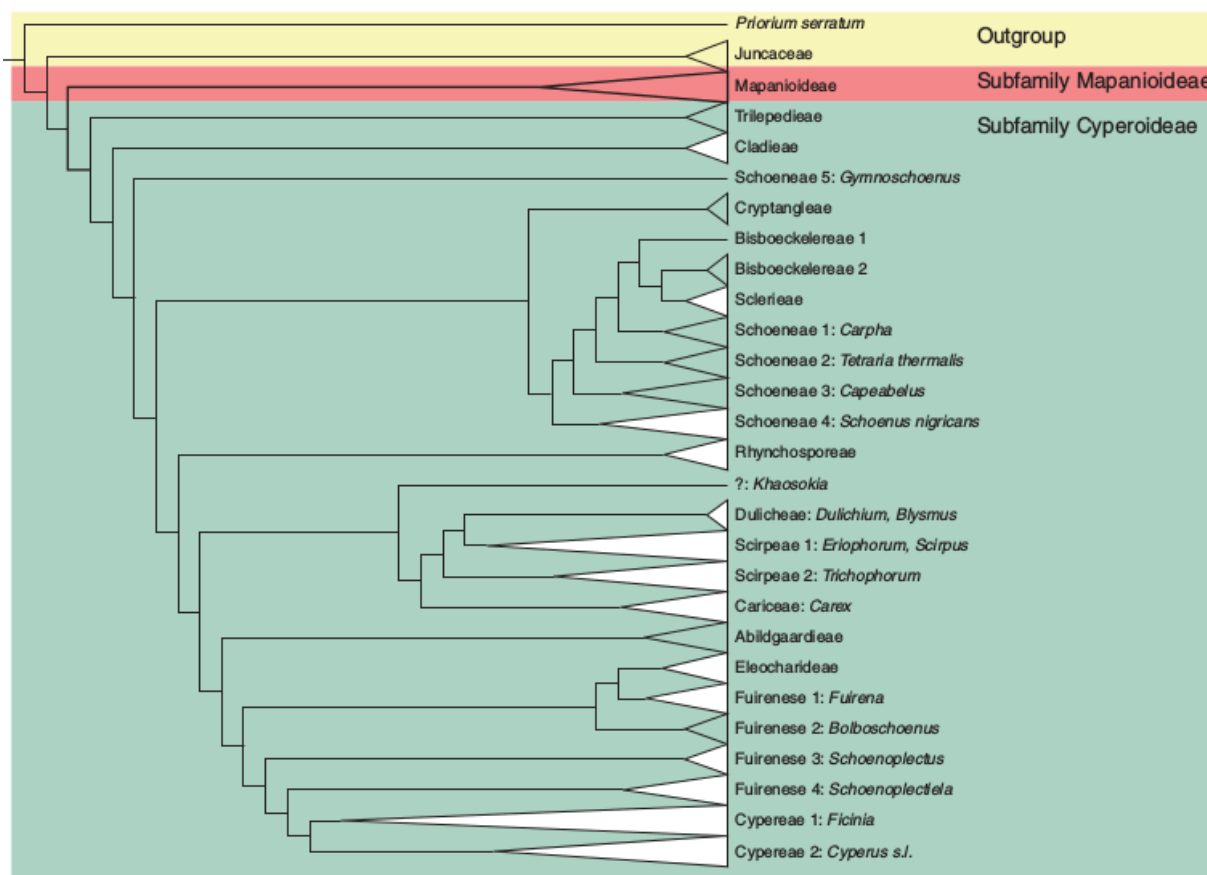


Figura 2. Filogenia simplificada de Cyperaceae. Vrijdaghs et al., (2010), adaptado de Muasya et al. (2009).

A família Cyperaceae também apresenta algumas características citológicas diferenciadas em relação à maioria das angiospermas. Seus representantes possuem cromossomos holocêntricos, sem constrições primárias. Tal característica também foi reportada em Juncaceae, Melanthiaceae, Droseraceae e Convolvulaceae (Melters et al., 2012). Há também a formação de

grãos de pólen dispersos na forma de pseudomônades (Håkansson, 1954), que aparecem devido a uma microsporogênese assimétrica, seguida de morte celular programada em três dos produtos meióticos da tétrade. Sendo assim, apenas um micrósporo, o funcional, origina o grão de pólen (Ranganath e Nagashree, 2000). A formação de apenas um grão de pólen por célula mãe do micrósporo também foi descrita em alguns membros de Ericaceae, mas apenas em Cyperaceae essa característica pode ser considerada uma sinapomorfia (Furness e Rudall, 2011). Outra característica diferenciada é meiose invertida, também chamada de pós-reducional. Nessa, as cromátides irmãs são co-orientadas na meiose I e separadas de maneira equacional, inverso ao que ocorre na maioria dos casos onde a segunda fase meiótica é equacional (Battaglia e Boyes, 1955; Mariath et al., 2012; Cabral et al., 2014).

Representantes de Cyperaceae têm importância econômica em alguns países, mas com alcance apenas local ou regional. *Cyperus papyrus*, por exemplo, tem reconhecimento histórico pela produção do papiro, com o registro datado de ~3.000 aC no Egito Antigo (Marota et al., 2002 *apud* Basile e Di Natale, 1994), mas várias espécies, embora muito utilizadas, foram ignoradas devido ao uso regionalizado na alimentação (tubérculos de *Actinoscirpus grossus* e *Cyperus bulbosus*, colmos de *Courtoisina assimilis* e *Cyperus amauropus*, e rizomas de *Bolboschoenus fluviatilis*), como também na medicina tradicional, para o tratamento de infecções (*Actinoscirpus grossus* e *Cyperus alternifolius*) e problemas respiratórios (*Cyperus articulatus*, *Fimbristylis squarrosa* e *Hypolytrum purpurascens*). Além das utilidades na alimentação de animais, artesanato e combustíveis, as ciperáceas são importantes para a recuperação de áreas degradadas, atuando na biorremediação do solo (Simpson e Inglis, 2001).

## **2.2. Gênero *Eleocharis* e a subsérie *Truncatae* e *Eleocharis***

O gênero *Eleocharis* possui cerca de 250 espécies, que são reconhecidas pela ausência de folhas, colmo não ramificado, inflorescência do tipo espiguetas não ramificadas no ápice do colmo, e presença de bainhas e brácteas (Goetghebeur, 1998). Esse gênero foi organizado em quatro subgêneros: *Limnochloa*, *Eleocharis*, *Scirpidium* e *Zinserlingia*; sete seções; oito séries e sete subséries, de acordo com critérios morfológicos e moleculares (González-Elizondo e Peterson, 1997). Entretanto, trabalhos de filogenia indicam que essa divisão não é monofilética, com

agrupamentos parafiléticos e polifiléticos (Roalson e Friar, 2000; Yano et al., 2004; Roalson et al., 2010).

Segundo Roalson et al. (2010), as subséries *Truncatae* e *Eleocharis* seriam exemplos de clados parafiléticos, onde se encontra o clado denominado “complexo *Eleocharis montana*” (Fig. 3). De acordo com González-Elizondo e Peterson (1997), espécies da subsérie *Truncatae*, como *E. contracta*, *E. montana* e *E. elegans*, têm ápice da bainha truncada com mucrão dorsal desenvolvido, enquanto espécies da subsérie *Eleocharis*, como *E. parodii* e *E. subarticulata*, apresentam entre outras características, ápice da bainha oblíquo. Essas informações sugerem que o processo evolutivo é marcado por uma sobreposição das características morfológicas diagnósticas nesse complexo, especialmente no colmo e bainha, em comparação aos clados mais próximos.

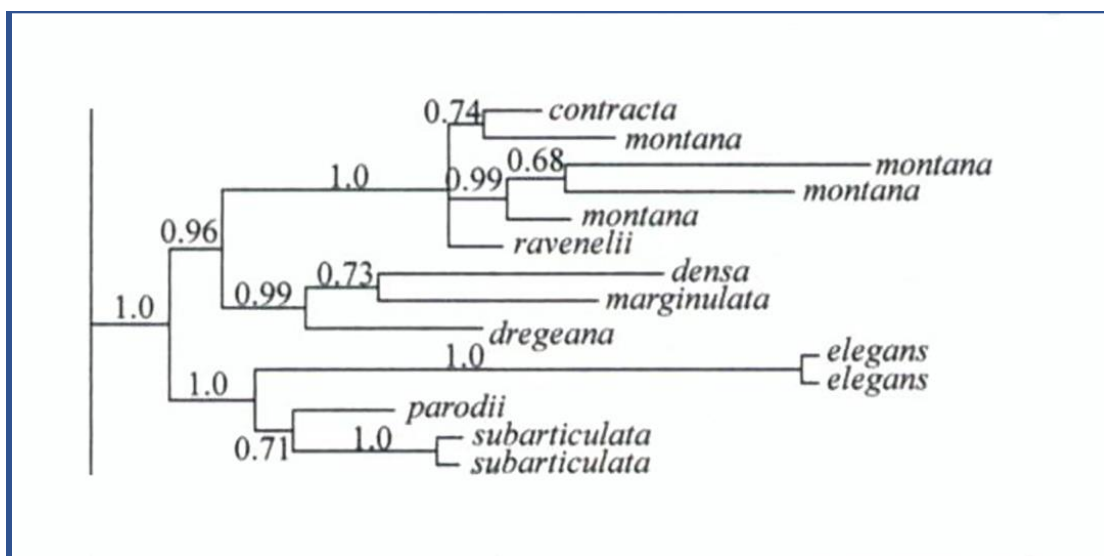


Figura 3. Posicionamento das espécies do Complexo *E. montana* na filogenia do gênero *Eleocharis*, baseada em marcadores genéticos e morfológicos. Adaptado de Roalson et al. (2010).

A micromorfologia da superfície do aquênio, obtida por microscopia eletrônica de varredura (Menapace, 1991; Da Silva et al., 2011), é uma característica importante na classificação do gênero. Um exemplo é a separação das espécies do subgênero *Eleocharis*, com células pequenas ou médias orientadas em linhas verticais, dos subgêneros *Scirpidium* e

*Limnochloa*, com células grandes e orientadas horizontalmente. A deposição de sílica na parede celular do aquênio também possui utilidade na definição taxonômica do gênero, uma vez que formam padrões distintos em espécies consideradas próximas, como lineares, sinuosos e severamente sinuosos (Fig. 4).

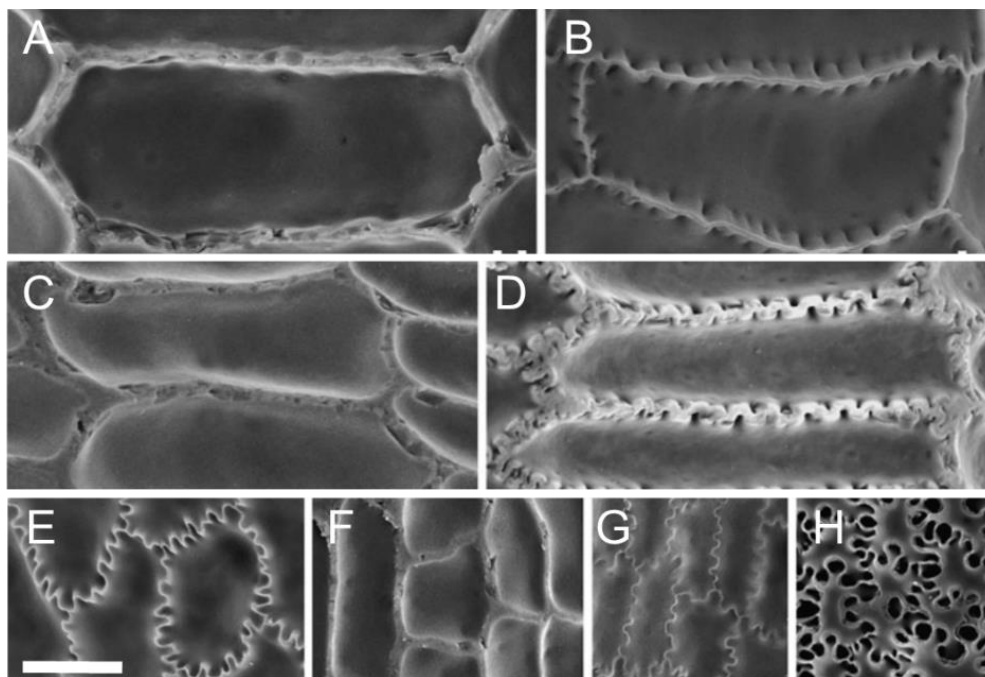


Figura 4. Micromorfologia da superfície do aquênio com microscopia eletrônica de varredura. A - *E. plicarhachis*; B - *E. obtusetrigona*; C - *E. squamigera*; D - *E. obtusetrigona*; E - *E. montana*; F - *E. montevidensis*; G - *E. contracta*; H - *E. parodii*. Adaptado de Da Silva et al., 2011.

As características citogenéticas do gênero são iguais às descritas anteriormente para a família. Os cromossomos holocêntricos, que foram reportados inicialmente por Håkasson (1954) em *Eleocharis*, foram observados em todos os estudos subsequentes no gênero, e essa característica parece estar ligada às variações numéricas decorrentes de dispoloidia (Da Silva et al., 2005, 2008), associada ou não à poliploidia (Roalson, 2008; Da Silva et al., 2010a; Melters et al., 2012). Esse tema foi bem explorado nos estudos de Da Silva e colaboradores (2005 e 2008). Há registros de redução do número cromossômico por simploidia em *E. maculosa* com  $2n = 10, 8, 7$  e  $6$  (Da Silva et al., 2008) e por dispoloidias múltiplas (quebra/fusão) em *E. subarticulata* com  $2n = 6$  (Da Silva et al., 2005). Além dos eventos de dispoloidia, outros trabalhos mostraram a importância da poliploidia

no gênero. Roalson (2008), estudou cerca de 50 espécies e encontrou números múltiplos de  $n = 5$ , 10 e 15. Da Silva et al. (2010a), também constataram ampla variação cromossômica numérica, e destacaram as variações intraespecíficas em *E. sellowiana* e *E. geniculata*, com  $2n = 10$  e 20, decorrente de poliploidia.

O complexo *E. montana* tem espécies com o número cromossômico variando de  $2n = 6$  a  $2n = 40$ , mas essa contagem foi feita apenas para quatro espécies, *E. subarticulata* (Fig. 5A), com evidências de rearranjos estruturais, como múltiplas fusões e fissões, enquanto que *E. contracta* (Fig. 5B), *E. montana* (Fig. 5C) e *E. elegans* (Fig. 5D) são poliploides (Da Silva et al., 2010a; Souza et al., 2018).

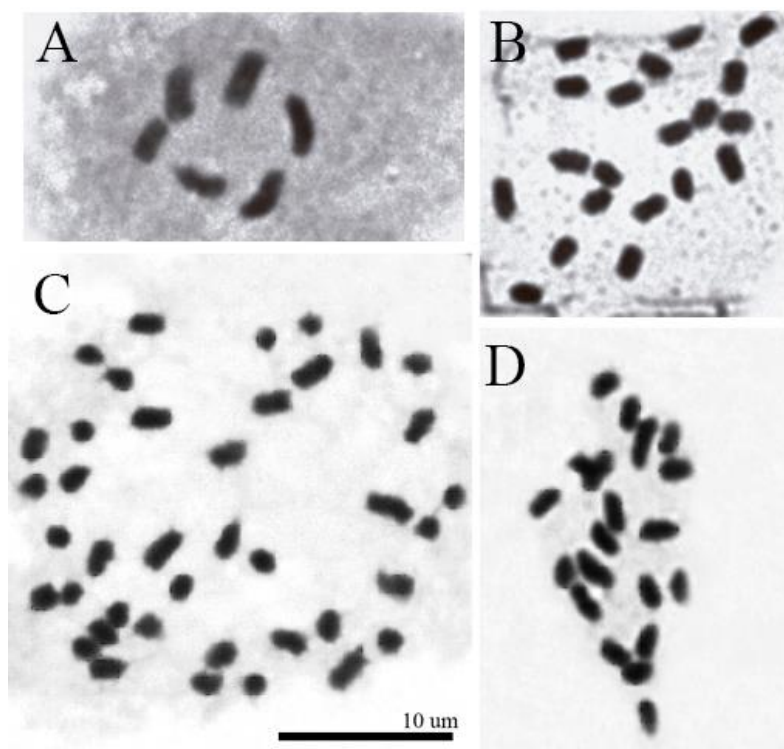


Figura 5. Metáfases mitóticas coradas convencionalmente com Giemsa, mostrando a diversidade no número cromossômico. A – *E. subarticulata*,  $2n = 6$ ; B – *E. elegans*,  $2n = 20$ , adaptados de Da Silva et al. (2010a); C – *E. montana*,  $2n = 40$  e D – *E. contracta*,  $2n = 20$ , adaptadas de Souza et al. (2018).

A citogenética contribuiu muito para a taxonomia desse grupo, já que há diferenças cariotípicas contrastantes entre as espécies dos subgêneros *Eleocharis* e *Scirpidium*, daquelas do subgênero *Limnochloa*. Nos primeiros subgêneros, há 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)

Espécies de *Eleocharis* foram comparadas do ponto de vista da fração repetitiva de DNA. O mapeamento físico cromossômico utilizando sondas de DNAr mostraram um acúmulo diferencial de sequências de DNAr 45S em múltiplos sítios terminais, enquanto que a fração de DNAr 5S apareceu, em sua maioria, como sítios intersticiais e em número reduzido (Da Silva et al., 2010b). Esses múltiplos sítios de DNAr 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, Da Silva et al., 2010b), e tais variações podem ter contribuído para as diferenças observadas nos valores C de DNA. Variações no conteúdo de DNA, também, foram associadas à poliploidia e à distribuição de retrotransposons com LTRs (LTR-RTs) (Zedek et al., 2010; Souza et al., 2018). Esses autores mostraram que há uma correlação positiva entre os níveis de ploidia e a quantidade de DNA nuclear, com algumas variações entre espécies com mesmo nível de ploidia, e que os LTR-RTs contribuem menos para tais diferenças (Zedek et al., 2010; Souza et al., 2018).

### 2.3. Citogenômica e citotaxonomia

A citogenética molecular possibilita a realização de estudos sobre a estrutura e dinâmica cromossômica, baseada na associação de técnicas convencionais, moleculares e de bioinformática. Esse conjunto de ferramentas permite caracterizar e localizar *in situ* de maneira eficiente, genes, sequências repetitivas, cromossomos isolados, marcadores moleculares amplificados por PCR, assim como genomas inteiros (Guerra, 2000; Mallet, 2007; Poczai, 2013). Tais informações, associadas às análises morfológicas e genômicas podem ser úteis em estudos biossistemáticos e evolutivos.

A quantificação do conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo vem ganhando muito espaço nas interpretações taxonômicas e biossistemáticas, haja vista que o valor C de DNA pode variar dentro e entre espécies, mas o valor do complemento monoploide ( $C_x$ ) tende a ser similar (Bennett e Leitch, 2005). A citometria de fluxo é um procedimento relativamente simples, cujo preparo do tecido é de fácil manipulação. Além disso, a população de núcleos

analisada é grande (~30 mil eventos) e pode ser medida em poucos minutos (Dolezel et al., 2007). Para Bennett et al. (2000), há correlação entre as variações do valor C de DNA com caracteres fenotípicos. Além disso, os mesmos autores sugeriram que no decorrer da evolução das plantas, angiospermas ancestrais possuíam uma menor quantidade de DNA, em relação aos genomas maiores das angiospermas derivadas. Um dos motivos dessa variação seria a alta ocorrência de poliploides.

A poliploidia pode ser explicada por dois mecanismos distintos. A autopoliploidia, cujo poliploide surge pela duplicação total do genoma seguida da ausência de citocinese; e a alopoliploidia, cujo poliploide surge a partir da hibridização de dois genomas distintos, seguida da replicação dos complementos, sem a citocinese (Stebbins, 1947; Lewis, 1980; Levin, 2002; Dar et al., 2017). Variações no tamanho dos genomas após eventos de poliploidia podem envolver mecanismos que afetam o equilíbrio dinâmico dos domínios cromossômicos (Lima-de-Faria, 1976; Leitch e Bennett, 2004), levando a estresses que podem, por vez, provocar amplificação e retração na quantidade das famílias de DNA repetitivo como, por exemplo, os elementos de transposição (Leitch e Bennett, 2004; Souza et al., 2018).

Estima-se que mais de 50% dos genomas vegetais seja repetitivo (Bennetzen, 2000; Elliott e Gregory, 2016). Esse fato, associado ao aprimoramento das ferramentas de bioinformática direcionadas às frações repetitivas, permite reconhecê-las e organizá-las de maneira sistemática em uma filogenia, além de viabilizar a construção de *primers* para a amplificação de segmentos de DNA a partir de moldes homólogos ou heterólogos. Tais sequências podem também ser checadas de modo comparativo, para a geração de sondas úteis para o mapeamento cromossômico. Por exemplo, a análise a partir de sequenciamento de baixa cobertura de genomas do gênero *Eleocharis* mostrou uma atividade independente para as diferentes famílias de retrotransposons (Souza et al., 2018).

A fração repetitiva pode ainda ser acessada sem que haja genomas ou sequências de referência. Para isso, podem ser utilizadas ferramentas que buscam por padrões repetitivos aleatórios, como por exemplo o TRF (*Tandem Repeats Finder*) e o SSRIT (*Simple Sequence Repeat Identification Tool*), que localizam motivos curtos ou *repeats* sem caracterizá-los (Benson, 1999; Temnykh, 2001). Embora essas ferramentas sejam úteis, há a necessidade adicional de investimento na caracterização e reconhecimento dessa fração. Em geral, as sequências curtas e não codificantes são classificadas de acordo com o tamanho: microssatélites

(1-6 pb), minissatélites (10-30 pb) e satélites (>30 pb) porém, existem outras características que devem ser levadas em consideração, como o modo de replicação, localização cromossômica e funções nucleotípicas (Garrido-Ramos, 2015).

Estudos baseados nessas sequências apontam diversas utilidades como o uso em análises populacionais com marcadores genéticos, na reconstrução de árvores filogenéticas ou para investigar contextos de parentesco entre espécies próximas (Schlötterer e Pemberton, 1998). Os marcadores construídos a partir de famílias repetitivas de DNA foram empregados de maneira eficiente em estudos de identificação de gênero e diagnóstico genético em *Hippophae rhamnoides*, com a utilização de marcadores *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR) (Das et al., 2017). Outro tipo de marcador é o REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), que consiste na construção de *primers* com o objetivo de amplificar sequências de DNA entre um elemento de transposição e um microsatélite. Essa técnica fornece marcas com uma alta cobertura genômica e especificidade (Poczai et al., 2013). Um exemplo de uso desses marcadores foi a separação por similaridade genética de 51 cultivares arroz (Branco et al., 2007) e de outras 27 subespécies de trigo (Carvalho et al., 2012).

Sequências repetitivas foram utilizadas em mapeamento cromossômico comparativo em vários grupos de Cyperaceae, como na identificação da dispersão de uma espécie invasora, o *Cyperus esculentus* (Dodet et al., 2008), na formação de híbridos nos gêneros *Schoenus* (Scotti et al., 2002), *Scirpus* (Yang et al., 2009), *Lepidosperma* (Wallace et al., 2011) e no subgênero *Limnochloa* (Kosnar et al., 2010).

Os marcadores genéticos podem indicar a ocorrência de híbridos e são úteis para compreender relações cariotípicas e genômicas. A técnica de GISH (*genomic in situ hybridization*) com sondas de DNA genômico, tem ajudado a compreender a origem de muitos híbridos, e tem permitido distinguir cromossomos oriundos de diferentes parentais, como foi observado na relação entre *Eleocharis viridans*, *E. niederleinii* e *E. ramboana*, que apresentam características morfológicas semelhantes e formam um complexo grupo genético derivado da hibridização natural entre duas ou mais espécies (Da Silva et al., 2017).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Geral

Caracterizar de maneira comparativa os representantes sul-americanos do complexo *E. montana* com enfoque evolutivo, relacionando rearranjos cromossômicos, hibridização, distribuição geográfica e taxonomia.

#### 3.2. Específicos

- 3.2.1. Comparar cinco espécies do complexo *E. montana* com base em caracteres morfológicos e anatômicos;
- 3.2.2. Comparar as características macro- e micro-morfológicas diagnósticas de *E. montana* e *E. contracta* e, assim, encontrar parâmetros de delimitação e sobreposição das duas espécies;
- 3.2.3. Comparar a estrutura genômica das espécies do complexo *E. montana* com base no conteúdo de DNA nuclear, estruturação dos cariótipos, marcadores genéticos – ISSR e REMAP e filogenia.
- 3.2.4. Comparar possíveis genomas híbridos por GISH, relacionar com a distribuição geográfica, definir o centro de diversidade e o perfil de irradiação das espécies desse complexo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. *Cyperaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB100>>. 2015

BASILE, C.; DI NATALE, A. **Il Museo del papiro di Siracusa**. Siracusa: Quaderni dell'Associazione Istituto Internazionale del Papiro, 1994.

BATTAGLIA, E.; BOYES, J. W. Post-Reductional Meiosis: Its Mechanism and Causes. **Caryologia**, v. 8, n. 1, p. 87-134, 1955.

BENNETT, M. D.; BHANDOL, P.; LEITCH, I. J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. **Annals of Botany**, v. 86, n. 4, p. 859-909, 2000.

BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Plant genome size research: a field in focus. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 1-6, 2005.

BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 251-269, 2000.

BENSON, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 573, 1999.

BRANCO, C. J. S. et al. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 2, p. 107-113, 2007.

CABRAL, G. et al. Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. **Nature Communications**, v. 5, p. 5070, 2014.

CARVALHO, A.; GUEDES-PINTO, H.; LIMA-BRITO, J. E. Genetic diversity in old Portuguese durum wheat cultivars assessed by retrotransposon-based markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 3, p. 578-589, 2012.

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.

DA SILVA, C. R. M. et al. Ornamentation of achene silica walls and its contribution to the systematics of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 2, p. 391-398, 2011.

DA SILVA, C. R. M. et al. Genome differentiation, natural hybridisation and taxonomic relationships among *Eleocharis viridans*, *E. niederleinii* and *E. ramboana* (Cyperaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 30, n. 2, p. 183-195, 2017.

DAR, T. H.; RAINA, S. N.; GOEL, S. Cytogenetic and molecular evidences revealing genomic changes after autopolyploidization: a case study of synthetic autotetraploid *Phlox drummondii* hook. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 641-650, 2017.

DAS, K. et al. ISSR markers for gender identification and genetic diagnosis of *Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica* growing at high altitudes in Ladakh region (Jammu and Kashmir). **Protoplasma**, v. 254, n. 2, p. 1063-1077, 2017.

DODET, M.; PETIT, R. J.; GASQUEZ, J. Local spread of the invasive *Cyperus esculentus* (Cyperaceae) inferred using molecular genetic markers. **Weed Research**, v. 48, n. 1, p. 19-27, 2008.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.

ELLIOTT, T. A.; GREGORY, T. Ryan. What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 370, n. 1678, p. 20140331, 2016.

FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Selective microspore abortion correlated with aneuploidy: an indication of meiotic drive. **Sexual Plant Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2011.

GARRIDO-RAMOS, M. A. Satellite DNA in plants: more than just rubbish. **Cytogenetic and genome research**, v. 146, n. 2, p. 153-170, 2015.

GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. In: KUBITZKI, K. (ed.) **Flowering Plants: Monocotyledons**. Berlin: Springer, 1998. p. 141-190.

GONZÁLEZ ELIZONDO, M. S.; TENA FLORES, J. A. *Eleocharis* (Cyperaceae) in the New World. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (eds). **Monocots: systematics and evolution**. Sidney: CSIRO, 2000. p. 637-643.

GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; PETERSON, P. M. A classification of and key to the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). **Taxon**, p. 433-449, 1997.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist of Cyperaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2015.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (eds.). **Monocots: systematics and evolution**. Sidney: CSIRO. p. 127-136, 2000.

HAINES, R. W.; LYE, K. A. The sedges and rushes of East Africa: a flora of the families Juncaceae and Cyperaceae in East Africa—with a particular reference to Uganda. Nairobi East African Natural History Society, 1983.

HÅKANSSON, A. Meiosis and pollen mitosis in x-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. **Hereditas**, v. 40, n. 3-4, p. 325-345, 1954.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Artmed, 632 p, 2009.

KOŠNAR, J. et al. Natural hybridization in tropical spikerushes of *Eleocharis* subgenus *Limnochloa* (Cyperaceae): evidence from morphology and DNA markers. **American journal of botany**, v. 97, n. 7, p. 1229-1240, 2010.

LEITCH, I. J.; BENNETT, M. D. Genome downsizing in polyploid plants. **Biological journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 4, p. 651-663, 2004.

LEWIS, W. H. Polyploidy in Angiosperms: Dicotyledons. In: LEWIS, W. H. (ed.) **Polyploidy. Basic Life Sciences**, v. 13. Boston: Springer, 241-268p, 1980.

LEVIN, D. A. The role of chromosomal change in plant evolution. Nova York: Oxford University Press, 240 p, 2002.

LIMA-DE-FARIA, A. The chromosome field. **Hereditas**, v. 83, n. 1, p. 1-22, 1976.

MALLET, J. Hybrid speciation. **Nature**, v. 446, p. 279-283, 2007.

MARIATH, J. E. A et al. Embryology of flowering plants applied to cytogenetic studies on meiosis. In: SWAN, A. (ed). **Meiosis-Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity**. InTech Open Access Publisher, 2012. p. 389-410.

MAROTA, I. et al. DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 117, n. 4, p. 310-318, 2002.

MELTERS, D. P. et al. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research**, v. 20, n. 5, p. 579-593, 2012.

MENAPACE, F. J. A preliminary micromorphological analysis of *Eleocharis* (Cyperaceae) achenes for systematic potential. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, n. 7, p. 1533-1541, 1991.

MUASYA, A. M. et al. Phylogeny of Cyperaceae Based on DNA Sequence Data: Current Progress and Future Prospects. **The Botanical Review**, v. 75, n. 1, p. 2-21, 2009.

POCZAI, P. et al. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 6, 2013.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Selective cell elimination during microsporogenesis in sedges. **Sexual Plant Reproduction** 13: 53-60, 2000.

ROALSON, E. H.; FRIAR, E. A. Infrageneric classification of *Eleocharis* (Cyperaceae) revisited: Evidence from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. **Systematic Botany**, v. 25, n. 2, p. 323-336, 2000.

ROALSON, E. H.; HINCHLIFF, C. Phylogenetic relationships in *Eleocharis* R. Br.(Cyperaceae): comparisons with classification, morphology, biogeography, and physiology. In: BARBOSA, L. M.; dos SANTOS Jr., N. A. (eds.). **A botânica no Brasil: pesquisa ensino e políticas públicas. 58º Congresso Nacional de Botânica**. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil, 2007. p. 304-307.

ROALSON, E. H. A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. **Botanical Review**, v. 74, p. 209-393, 2008.

ROALSON, E. H. et al. Phylogenetic relationships in *Eleocharis* (Cyperaceae): C4 photosynthesis origins and patterns of diversification in the spikerushes. **Systematic Botany**, v. 35, n. 2, p. 257-271, 2010.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations—a critical review. **Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser Basel, 1998.

SCOTTI, I. et al. AFLP markers and cytotoxic analysis reveal hybridisation in the genus *Schoenus* (Cyperaceae). **Genome**, v. 45, n. 2, p. 222-228, 2002.

SEMMOURI, I. et al. Phylogeny and Systematics of Cyperaceae, the Evolution and Importance of Embryo Morphology. **The Botanical Review**, p. 1-39, 2018.

SIMPSON, D. A. Some problems in *Eleocharis*: notes on Brazilian Cyperaceae III. **Kew Bulletin**, v. 43, n. 1, p. 127-134, 1988.

SIMPSON, D. A.; INGLIS, C. A. Cyperaceae of economic, ethnobotanical and horticultural importance: a checklist. **Kew Bulletin**, v. 56, n. 2, p. 257-360, 2001.

SIMPSON, D. A. et al. Phylogenetic relationships in Cyperaceae Subfamily Mapaniodeae inferred from pollen and plastid DNA sequence data. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 7, p. 1071-1086, 2003.

SIMPSON, D. A. et al. Phylogeny of Cyperaceae based on DNA sequence data - A new *rbcl* analysis. **Aliso**, v. 23, p. 72-83, 2007.

SOUZA, T. B. et al. Analysis of retrotransposon abundance, diversity and distribution in holocentric *Eleocharis* (Cyperaceae) genomes. **Annals of Botany**. 2018.

STEBBINS Jr, G. L. Types of polyploids: their classification and significance. In: **Advances in genetics**. Academic Press, 1947. p. 403-429.

TEMNYKH, S. et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome research**, v. 11, n. 8, p. 1441-1452, 2001.

TREVISAN, R. *Eleocharis* (Cyperaceae) na Região Sul do Brasil. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 225 p, 2009.

UENO, O.; SAMEJIMA, M.; KOYAMA, T. Distribution and evolution of C4 syndrome in *Eleocharis*, a sedge group inhabiting wet and aquatic environments, based on culm anatomy and carbon isotope ratios. **Annals of Botany**, v. 64, n. 4, p. 425-438, 1989.

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.

VRIJDAGHS, A. et al. Spikelet structure and development in Cyperoideae (Cyperaceae): a monopodial general model based on ontogenetic evidence. **Annals of Botany**, v. 105, n. 4, p. 555-571, 2010.

YANG, M. et al. AFLP markers in the detection of *Scirpus* × *mariqueter* (CYPERACEAE) hybrid in China. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 4, p. 298-302, 2009.

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.

YANO, O.; TANAKA, N.; ITO, Y. Molecular evidence for a natural hybrid between *Isolepis crassiuscula* and *Isolepis lenticularis* (Cyperaceae) in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 54, n. 4, p. 433-445, 2016.

ZEDEK, F. et al. Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 265-275, 2010.

WALLACE, M. J.; BARRETT, M. D.; BARRETT, R. L. Novel chloroplast markers for the study of intraspecific variation and hybridisation in the *Lepidosperma costale* species complex (Cyperaceae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 2, p. 355-360, 2011.

Artigo a ser submetido para a revista **American Journal of Botany**.

## ORIGEM E VIGOR ADAPTATIVO DE ALOPOLIPLÓIDES EM CYPERACEAE: UM ESTUDO DE CASO NO

### COMPLEXO *Eleocharis montana*

Lucas Johnen<sup>1</sup>, André Luís Laforga Vanzela<sup>1\*</sup>

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

A aloploidia é um tipo de rearranjo cromossômico caracterizado por eventos de hibridização seguidos de poliploidizações e pode ser percebida na natureza pela ocorrência de espécies com números cromossômicos elevados, diferentes níveis de ploidia e populações amplamente adaptadas, em relação aos parentais. O gênero *Eleocharis* (Cyperaceae) espécies com cromossomos holocêntricos, vários registros de disploidia e poliploidia e casos de hibridização, além de uma filogenia com grupos parafiléticos ou completamente artificiais, que levam a incertezas sobre a história evolutiva. A morfologia do gênero é marcada por caracteres plesiomórficos, estruturas florais com tamanhos reduzidos e por pequenas variações no tamanho de estruturas como colmos e aquênios. O objetivo desse estudo foi caracterizar de maneira comparativa os representantes do continente sul-americano do complexo *E. montana* sob o ponto de vista evolutivo, relacionando morfologia, anatomia, diversidade genômica e cariotípica e distribuição geográfica. A morfo-anatomia associada a morfometria mostrou um possível processo de hibridização natural no complexo *E. montana*, devido a sobreposição de características entre *E. contracta*, *E. elegans* e *E. montana*, comparativamente à *E. parodii* e *E. subarticulata*. Pelo menos para *E. contracta* de *E. montana*, não houve diferenças claras capazes de diferenciá-las, e o mesmo aconteceu entre as diferentes populações analisadas de *E. montana*. A comparação dos valores C de DNA indica que as variações nos tamanhos dos genomas se dão principalmente pela poliploidia, como anteriormente reportado para o gênero, sendo os disploides pouco importantes para tais diferenças. A filogenia do grupo baseada DNAr divergiu das demais análises, já que aproximou *E. elegans* de *E. parodii* e *E. subarticulata*, em relação a *E. contracta* e *E. montana*, contudo, o mesmo não ocorreu na análise de marcadores moleculares. Essa análise separou todas as espécies, deixando *E. elegans* um pouco mais próxima de *E. contracta* e *E. montana*. A hibridização genômica *in situ* confirmou a formação de híbridos tetraploides (*E. elegans* e *E. contracta*), tendo como um dos genomas parentais para ambas *E. parodii* e sustentou um ciclo a mais de poliploidia na formação de *E. montana* a partir de *E. contracta*. Nossos resultados mostraram que o Sul da América do Sul é o centro de dispersão e provável a zona de hibridização do complexo *E. montana*. Dentre os poliploides *E. elegans* (tetraploide) e *E. montana* (octaploide) tiveram sucesso na irradiação até as Américas Central e do Norte, enquanto que *E. contracta* manteve-se na zona híbrida em um número reduzido de populações, similarmente aos diploide e disploide.

**Palavras chave:** biosistemática, citometria de fluxo, disploides, GISH, híbridos, marcadores moleculares, poliploides.

## INTRODUÇÃO

A alopoliploidia é um rearranjo cromossômico caracterizado por eventos de hibridização, seguida da duplicação do genoma híbrido e pode ser percebida na natureza pela ocorrência de espécies com números cromossômicos e valores C de DNA elevados, com diferentes níveis de ploidia em relação aos parentais e populações adaptadas a diferentes habitats (Whitney et al., 2010; Dar et al., 2017). Em condições naturais, é muito difícil reconhecer um híbrido em campo, isso porque nem sempre as novas linhagens apresentam um conjunto de características morfológicas diagnósticas indicativas da hibridização (Queiroz, 2007). Outro fator que dificulta a identificação de híbridos é a variabilidade nas características morfológicas, com formas intermediárias ou ausentes em relação aos parentais (Kerbs et al., 2017).

A família Cyperaceae é marcada por grandes variações cromossômicas numéricas, decorrentes de agmatoploidia (fissão) e simploidia (fusão) e também pela poliploidia, que amplia o número de complementos monoploides. Embora existam muitos estudos reportando a ocorrência de poliploides e disploides nessa família (Saunte, 1958; Catling et al., 1989; Catling, 1994; Bures, 1998; Fay et al., 2003; Yang et al., 2009; Košnar et al., 2010, Kaur et al., 2011; Więclaw e Wilhelm, 2014; Pedersen et al., 2016; Yano et al., 2016; Da Silva et al., 2017), a ocorrência de híbridos com reconhecimento dos parentais não foi bem documentada. Dentro da família Cyperaceae, o gênero *Eleocharis* exhibe variações de  $2n = 6$  em *E. subarticulata* (Da Silva et al., 2005) a  $2n = 196$  em *E. huroguwai* (Hoshino, 1987), com conteúdo de DNA variando de 0,84 pg em *E. cellulosa* a 18 pg em *E. sternerii* (Zedek et al., 2010), com espécies organizadas em clados para e polifiléticos (Roalson et al., 2010). Apesar da grande diversidade genética, os representantes desse gênero apresentam um conjunto limitado de características morfológicas diagnósticas, sendo, em geral, de tamanhos muito reduzidos, restritas ao colmo, bainha, espigueta, glumas e aquênios (González-Elizondo e Tena-Flores, 2000; Trevisan, 2009). O contraste entre diversidade nas características genômicas/cariotípicas e morfológicas/anatômicas nem sempre permite delimitar as espécies em agrupamentos que realmente refletem seus parentescos. O clado denominado “complexo *Eleocharis montana*” por Roalson et al. (2010), por exemplo, se enquadra nesse perfil geral, haja vista a sobreposição de caracteres morfológicos associada à diversidade genômica.

Esse clado tem nove espécies muito semelhantes morfológicamente, das quais cinco ocorrem na América do Sul, *E. parodii*, *E. subarticulata*, *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana* (WCSP: World Checklist of Selected Plant Families, 2014). Essas espécies apresentam números que variam de  $2n = 6$  a 40 (Da Silva et al., 2010a; Souza et al., 2018) e valor C de DNA de 1,57 a 4,75 pg, com diploide ( $2n = 10$ ), dispoloide ( $2n = 6$ ) e tetraploide ( $2n = 20$ ) ocupando uma área mais restrita no sul da América do Sul, e duas espécies tetraploide ( $2n = 20$ ) e octaploide ( $2n = 40$ ) que se expandiram desde o sul da América do Sul até a região central da América do Norte.

Apesar da filogenia molecular alocar todas essas espécies em um clado (Roalson et al., 2010), a relação entre as espécies desse complexo ainda é incerta e não pôde ser esclarecida apenas com dados moleculares. Isso justifica uma análise conjunta com dados mais detalhados de morfologia, anatomia, números cromossômicos, níveis de ploidia, marcadores moleculares e distribuição geográfica. Diante de informações prévias sugerirem a ocorrência de eventos de hibridização e da dificuldade em elucidar parentescos e processos de especiação no complexo *E. montana*, o foco desse trabalho foi explorar as relações biosistemáticas nesse grupo de plantas em uma perspectiva mais ampla. Com isso, espera-se compreender os principais mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e especiação, assim como definir uma possível zona geográfica de hibridização e um modelo de distribuição das espécies sul-americanas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Material biológico*

Foram coletados: i) 92 indivíduos de *Eleocharis montana* em 17 populações, nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, ii) três indivíduos de *E. contracta* em duas populações de Santa Catarina, iii) quatro indivíduos de *E. elegans* de uma população no Mato Grosso do Sul, iv) nove indivíduos de *E. subarticulata* em duas populações, nos estados de São Paulo e Santa Catarina e v) três indivíduos de *E. parodii* em uma população do Rio Grande do Sul (Fig. 1 e Tab. 1). As identificações foram realizadas com base nas descrições de González-Elizondo e Peterson (1997), Trevisan (2005; 2009), Gil e Bove (2007). As amostras foram mantidas na casa de vegetação do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE/CCB) da Universidade Estadual de Londrina.

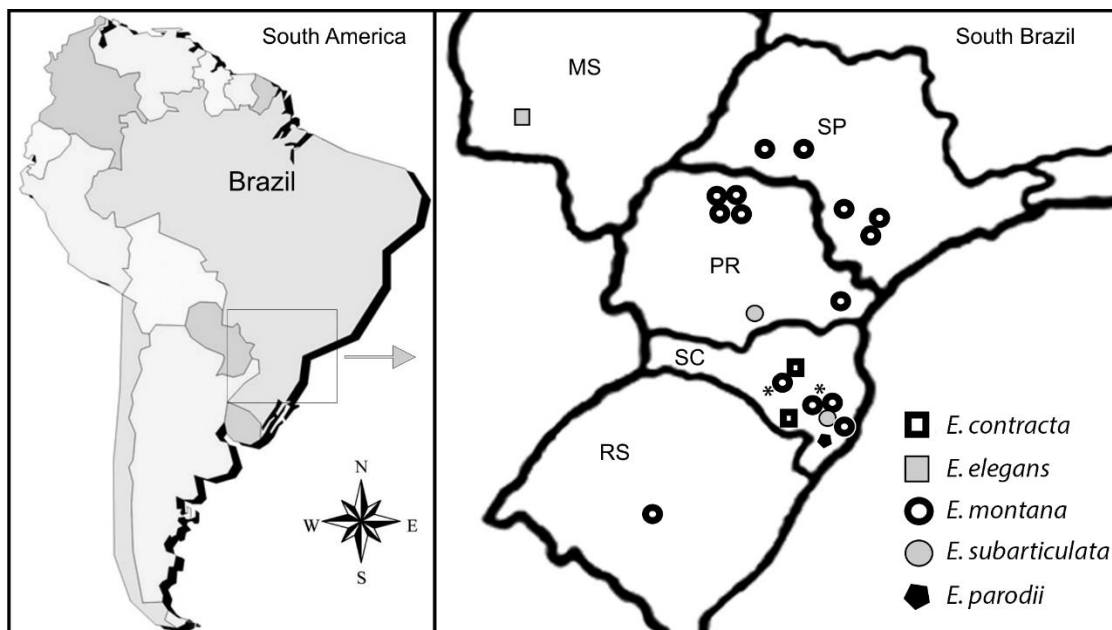


Figura 1. Localização geográfica das populações coletadas e identificadas de *E. contracta*, *E. montana*, *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii*. Algumas populações próximas de *E. montana* estão representadas por um único ponto de referência no mapa, o asterisco (\*) representa esses locais com mais de uma população.

Tabela 1 – Lista das populações de cada espécie com o número de indivíduos.

Espécie	nº indivíduos	População	Espécie	nº indivíduos	População
<i>E. montana</i>	2	Antonina-PR	<i>E. montana</i>	2	Curitibanos - SC
<i>E. montana</i>	5	Rolandia - PR	<i>E. montana</i>	4	Cacador - SC
<i>E. montana</i>	3	Londrina - PR	<i>E. montana</i>	3	Calmon - SC
<i>E. montana</i>	6	Prado Ferreira - PR	<i>E. montana</i>	6	Florianópolis - SC
<i>E. montana</i>	4	Florestópolis - PR	<i>E. montana</i>	14	Rancho Queimado - SC
<i>E. montana</i>	3	Buri - SP	<i>E. montana</i>	4	Tupã - SP
<i>E. montana</i>	9	Guapiara - SP	<i>E. contracta</i>	2	Calmon - SC
<i>E. montana</i>	1	Rancharia-SP	<i>E. contracta</i>	1	São Joaquim - SC
<i>E. montana</i>	10	São Gabriel - RS	<i>E. elegans</i>	4	Miranda - MS
<i>E. montana</i>	12	Bom Retiro - SC	<i>E. subarticulata</i>	1	Pinhao - PR
<i>E. montana</i>	4	Bocaina -SC	<i>E. subarticulata</i>	8	Rancho Queimado - SC

### Morfologia, morfometria e anatomia

A análise morfológica comparativa das cinco espécies, baseadas nas características dos colmos, espiguetas, aquênios e glumas, foi realizada de acordo com os critérios diagnósticos descritos por Trevisan (2005, 2009), por meio de medições a olho nú e em estereomicroscópio. Para avaliar a diversidade morfológica de *E. montana*, foram comparados 42 indivíduos de 19

populações. Para todos os casos, foram realizadas 10 repetições por estrutura por indivíduo, respeitando os seguintes critérios: 1) diâmetro da porção mediana do colmo, com inflorescência madura; 2) comprimento da espiguetta, com aquênios maduros, a partir da primeira gluma (estéril) até o ápice; 3) altura do aquênio maduro, a partir da base até o ápice do estilopódio e 4) altura da gluma, da base até o ápice. As fotos foram feitas em microscópio estereoscópio S6D contendo uma câmera EC3, ambos Leica. As medições foram realizadas com paquímetro e uma régua com escala de 0,5 mm, e auxílio do programa GIMP 2.8 em ambiente Linux. Valores médios, desvio padrão e a variância foram calculados no programa LibreOffice Calc, também em ambiente Linux.

A comparação da forma bidimensional dos aquênios das cinco espécies foi feita por análise de componentes principais baseado no perímetro, área e forma das estruturas. Para tal, foram obtidos registros de 50 aquênios por espécie utilizando um estereomicroscópio. As imagens foram tratadas e organizadas no programa LeafAnalyser 2.3.0., com seleção de 48 *landmarks*, considerando a orientação dos aquênios a partir do ápice do estilopódio. Este mesmo programa foi usado para a obtenção de esquemas comparativos das formas médias dos aquênios. Os gráficos de saída foram editados no programa GIMP 2.8, Linux.

Para a análise anatômica dos colmos, foram realizados cortes à mão livre utilizando navalhas de aço descartáveis, em fragmentos obtidos da porção mediana do colmo, com inflorescência madura. Os cortes foram colocados em água destilada e em seguida corados por alguns segundos com azul de toluidina a 0,05%, em tampão fosfato pH 6,8. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada, colocados em lâminas de vidro e cobertos por lamínula. O material foi observado e fotografado no microscópio de luz DM4500B, acoplado com uma câmera DFC300FX, ambos Leica. As imagens foram editadas para brilho e contraste no programa GIMP 2.8, Linux.

### *Citometria de fluxo*

A determinação do conteúdo de DNA nuclear foi feita com colmos jovens das cinco espécies: *E. montana*, *E. contracta*, *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii*, tendo como padrão externo *Solanum lycopersicum*,  $2C = 1,96$  pg (Dolezel et al., 2007). Amostras (padrão+amostra) foram fragmentadas em 125  $\mu$ L de tampão Otto I, suplementado com 22  $\mu$ L de polietileno glicol

40% (PEG) e 6  $\mu\text{L}$  de RNase. Posteriormente, foi adicionado outro volume de 125  $\mu\text{L}$  de tampão Otto I e incubado por 2 minutos em temperatura ambiente. A solução foi filtrada em malha de nylon de 25  $\mu\text{m}$  e centrifugada a 100g por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de tampão Otto I ao precipitado. As amostras foram coradas com uma solução contendo 90  $\mu\text{L}$  de Otto I, 180  $\mu\text{L}$  de Otto II, 65  $\mu\text{L}$  de PEG a 40%, 19  $\mu\text{L}$  de RNase 1 mg/mL e 19  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídeo (1mg/mL). A solução foi incubada no escuro por 40 min e filtrada novamente. As análises foram realizadas em, no mínimo, três repetições (~30 mil núcleos), utilizando o citômetro de fluxo ACCURI C6 da BD, 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. A partir desses valores foram calculados os valores haploides (C) e monoploide (Cx), comparando por ANOVA e teste de Tukey a variação das médias desses valores.

#### *Marcadores moleculares*

Foram analisadas 16 amostras de *Eleocharis montana*, três de *E. contracta*, três de *E. elegans*, cinco de *E. subarticulata* e três de *E. parodii*. Para tal, o DNA total foi extraído de colmos jovens utilizando o método do CTAB (Romano et al., 1998). Colmos foram macerados em nitrogênio líquido e tratados com tampão de extração contendo Tris/HCl (1M e pH 8,0), NaCl (5M), EDTA (0,5M e pH 8,0), CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, 99%) e PVP (polivinilpirrolidona, 1%). As amostras foram purificadas com uma solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1, v:v) e centrifugadas a 10.000 RPM por 10 min, descartando o sobrenadante. Após esse procedimento, o DNA foi precipitado em etanol absoluto e eluído em Tris/HCl pH 8,0. A qualidade e a quantidade do DNA foram checadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% e em NanoDrop 2000 (Thermo).

Foram empregadas duas análises de marcadores moleculares, *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) e *Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism* (REMAP), considerando a representatividade dessas frações repetitivas nos genomas vegetais. Para isso, o genoma de *E. elegans* foi parcialmente sequenciado por Illumina Miseq na Universidade da Georgia, EUA. Os arquivos de saída R1.fastq e R2.fastq, representando 0,2 $\times$  de cobertura, foram aferidos com o programa FASTQx, e filtrados com o *script* Trimomatic, para a retirada de

adaptadores e sequências de baixa qualidade. Os arquivos limpos foram utilizados para a montagem do genoma com o programa SPAdes, em ambiente Linux, empregando *K*-mers 41 e 71. A partir da montagem, foi realizada uma varredura dos SSRs com o *script* SSRIT (*Simple Sequence Repeat Tool*). O arquivo de saída foi utilizado para checar a frequência dos principais SSRs, organizados em dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros e hexâmeros, e os mais frequentes foram selecionados para o desenho de *primers*. Dentre os oligômeros testados, o GA foi o que melhor respondeu à PCR, sendo então escolhido para os procedimentos subsequentes de ISSR. Para o REMAP foram utilizados *primers forward* genéricos para a região conservada da transcriptase reversa (RT) de retrotransposons das superfamílias *Gypsy* 5'-GCCGGGCCATTAGTATTTT 3' e *Copia* 5'-GCTCAAGAGGCACTTCTGGT 3' (Souza et al., 2018), e o oligômero GA de SSR como *reverse*, em reações de PCR independentes para cada superfamília.

Nos três casos, a amplificação foi feita por PCR utilizando as seguintes reações: i) ISSR - 0,5 µL de Taq polimerase a 5 U/µL; 2,5 µL tampão 10×; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 1 µL de dNTP a 10 mM, 4 µL de *primer* GA<sub>9</sub>+C a 5 mM e H<sub>2</sub>O para um volume final de 25 µL. ii) REMAP, o mix foi composto por: 0,5 µL de Taq polimerase a 5 U/µL; 2,5 µL tampão 10×; 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM; 1 µL de dNTP a 10 mM, 2 µL de cada primer (RT *Copia* ou RT *Gypsy*) a 5 mM e H<sub>2</sub>O 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, 60 °C por 40 s, 72 °C por 1 min, finalizando com 72 °C por 10 min (Kalendar e Schulman, 2006). Os produtos das reações foram checados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, a 3 V/cm, coradas com brometo de etídio e fotografadas com câmera Olympus C-5060 Media.

Para cada gel, o perfil de bandas foi convertido em uma matriz binária, atribuindo-se 1 para presença e 0 para ausência da banda. A análise dos dados foi realizada utilizando o coeficiente de Jaccard para gerar uma matriz de similaridade, a qual foi convertida em uma matriz de distância, seguida da elaboração de um dendograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pairwise Group Method using Arithmetic Average*). Todas as análises foram realizadas no site <http://genomes.urv.es/UPGMA/> (Garcia-Vallvé et al., 1999) e o dendograma foi editado no programa Figtree 1.4.2. (Rambaut, 2007), em ambiente Linux.

*Filogenia baseada em sequências de DNAr 5.8S + ITS*

As sequências de DNAr baixadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), são relativas aos trechos de ITS 1+ DNAr 5.8S + ITS 2 (Roalson et al., 2010), com os seguintes acessos: *E. montana* (GU110921.1), *E. contracta* (GU110790.1), *E. elegans* (GU110804.1), *E. subarticulata* (GU110926.1), *E. parodii* (GU110862.1) e *E. acutangula* (AB180701.1) como grupo externo ao complexo *E. montana*. As sequências foram analisadas seguindo a rotina: i) alinhamento com o Muscle, ii) verificação do alinhamento com Gblocks, iii) organização da árvore filogenética baseada na máxima verossimilhança usando o PhyML e também na inferência bayesiana com o MrBayes e iv) renderização com TreeDyn (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>). O dendograma foi editado no programa Figtree 1.4.2. (Rambaut, 2007), em ambiente Linux. As sequências foram também alinhadas com o programa Mauve, para comparar trechos conservados e variáveis em uma interface gráfica de gradação de similaridade entre blocos. A imagem de saída foi editada no programa GIMP 2.8, em ambiente Linux.

#### *Citogenética convencional e molecular*

Para o preparo de lâminas convencionais, raízes foram coletadas e tratadas com 8-hidroxiquinolina a 2 mM por 24h. As amostras foram fixadas em álcool etílico e ácido acético (3:1, v:v) e estocadas a -20 °C, ou utilizadas imediatamente. As raízes foram tratadas com uma solução enzimática contendo celulase:pectinase (2:20, m:v) a 37 °C até o amolecimento, e hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) 1M por 10 min a 60°C. As amostras foram esmagadas em uma gota de ácido acético 60%, a lamínula retirada após congelamento em nitrogênio líquido, coradas com Giemsa 2% e montadas permanentes com Entellan (Guerra e Souza, 2002). As imagens foram obtidas em microscópio de luz DM4500B acoplado com uma câmera DFC300FX, ambos Leica, e otimizadas para brilho e contraste com o programa GIMP 2.8 em ambiente Linux.

Para a citogenética molecular, foi empregada a GISH (*genomic in situ hybridization*). Para tal, as raízes coletadas e fixadas, como descrito anteriormente, foram digeridas em uma solução composta por celulase e pectinase (2:20, m:v) por 4h30 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 ácido acético 60% (10 a 15 min em banho maria a 40 °C). Em seguida, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica.

Para a GISH, foi adicionada à lâmina 34  $\mu\text{L}$  de um *mix* contendo formamida deionizada 100 %, polietilenoglicol 50 %, SDS 10 %, 20 $\times$  SSC e 300 ng de sonda marcada (adaptado de Parokonny et al., 1992). As sondas foram geradas a partir do DNA genômico das cinco espécies, de acordo com a extração de DNA descrita anteriormente. O DNA foi fragmentado em autoclave a 1 atm por quatro minutos, seguida de resfriamento rápido a 0 °C por 10 minutos. O DNA fragmentado foi marcado utilizando a reação de *Random Primers* (BioPrimer, Invitrogen, EUA), contendo um dos nucleotídeos conjugados com biotina-11-dUTP, de acordo com as instruções do fabricante. As hibridizações foram conduzidas com sondas de todas as espécies contra os cromossomos de todas as espécies, exceto para *E. subarticulata* que não foi comparada por GISH.

O conjunto lâmina + *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 *in situ* 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 estringência de 60 %, com 6 $\times$  SSC e em 4 $\times$  SSC/0,2% Tween 20. Na detecção, foi utilizada uma mistura de avidina-FITC e BSA 5%, seguindo por lavagens pós-deteção em 4 $\times$  SSC/0,2% Tween 20. Após as lavagens pós-deteção, as lâminas foram montadas em um meio contendo 21  $\mu\text{L}$  de antifade (DABCO), 4  $\mu\text{L}$  de DAPI 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2  $\mu\text{L}$  de cloreto de magnésio (25mM). As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência DM4500B (Leica) e otimizadas para brilho e contraste com o programa GIMP 2.8.

## RESULTADOS

### *Morfologia e morfometria*

Os resultados da análise morfológica mostraram que não há sinapomorfias no complexo *E. montana*. A morfologia dos aquênios permitiu a separação das espécies em três grupos. O primeiro é representado pelos aquênios de *E. subarticulata* e *E. elegans*. Esses foram claramente trígonos, com estilopódio piramidal mais estreito e mais longo (~1.5 - 2.0 mm) e cerdas hipóginas mais longas que o corpo do aquênio (Figs. 2A e 2I). O segundo foi representado pelos aquênios trígonos de *E. parodii*, com colo curto no ápice, estilopódio piramidal e de tamanho reduzido (< 1,0 mm) e cerdas hipóginas menores que o corpo do aquênio (Fig. 2E). No terceiro caso, os aquênios de *E. contracta* e *E. montana* foram biconvexos a trígonos, estilopódio piramidal com a base mais larga, cerdas hipóginas mais curtas ou do mesmo comprimento que o

corpo do aquênio e ~1 mm de comprimento, considerando o estilopódio (Figs. 2M e 2Q). O formato do estilopódio chamou a atenção pela diferença de tamanho, que foi desde muito reduzido em *E. parodii* (aproximadamente 1/8 do tamanho do corpo do aquênio) a muito longo em *E. elegans*, o qual alcançou o mesmo comprimento e a metade da largura do corpo do aquênio (Fig. 2). *Eleocharis montana*, diferentemente das demais, mostrou uma maior diversidade de tamanho, com claro gradiente na estrutura geral do aquênio (Fig. 2A).

As glumas exibiram variação na cor, desde oliváceo à castanho, e na margem, com variações na borda hialina. Em *E. elegans*, as glumas foram membranáceas e oblongas (2J), enquanto que nas demais espécies o formato foi ovóide (Figs. 2B, 2F, 2N e 2R). O ápice da gluma foi do tipo agudo em *E. subarticulata* e *E. elegans* (Figs. 2B e 2J), acuminado a agudo em *E. contracta* e *E. montana* (Figs. 2N e 2R), e com ápice obtuso-apiculado em *E. parodii* (Fig. 2F). As espiguetas variaram de cilíndricas com ~600 flores em *E. elegans* (Fig. 2K) e em *E. parodii* com ~700 flores (Fig. 2G), a lanceoladas com 30-50 flores em *E. subarticulata* (Fig. 2C), e lanceoladas-ovoides em *E. montana* (20-400 flores) e *E. contracta* com 20-150 flores (Figs. 2T e 2O, respectivamente).

Os colmos variaram quanto ao comprimento (de curtos a longos), espessura, assim como quanto à presença, ausência e simetria dos tabiques. Os tabiques foram distribuídos de maneira irregular em *E. elegans*, *E. montana* e *E. contracta* (Figs. 2L, 2U e 2P, respectivamente) e ausentes em *E. subarticulata* e *E. parodii* (Fig. 2D e 2H). Nessas duas últimas espécies os colmos foram esponjosos. O ápice da bainha foi truncado com mucrão dorsal desenvolvido em *E. elegans*, *E. montana* e *E. contracta* (Figs. 2L, 2U e 2P, respectivamente), oblíquo com um pequeno mucrão em *E. parodii* (Fig. 2H) e ausente em *E. subarticulata* (Fig. 2D).

A análise comparativa dos formatos e tamanhos dos aquênios demonstraram que 96% das amostras pode ser separada por três componentes principais: PC1, PC2 e PC3 (Figs. 3F, 3G e 3H). Essas variações encontradas em PC1 (Fig. 3F), sugerem que há uma divergência de 82% no tamanho e na forma do estilopódio, desde alongado e com o ápice mais agudo, até achatado e com ápice obtuso (Fig. 3A - 3E). Além disso, houve sobreposição de algumas amostras de *E. contracta* e *E. montana*, devido ao formato piramidal mais curto do estilopódio e tamanho do aquênio (Figs 3A, 3B e 3I). A análise de componentes também agrupou *Eleocharis elegans* e *E. subarticulata* pelo estilopódio piramidal alongado (Figs 3C, 3D e 3I) e distanciou *E. parodii*,

devido ao tamanho reduzido do corpo do aquênio e estilopódio, e também, pela presença de um colo curto no ápice do aquênio (Figs 3E e 3I).

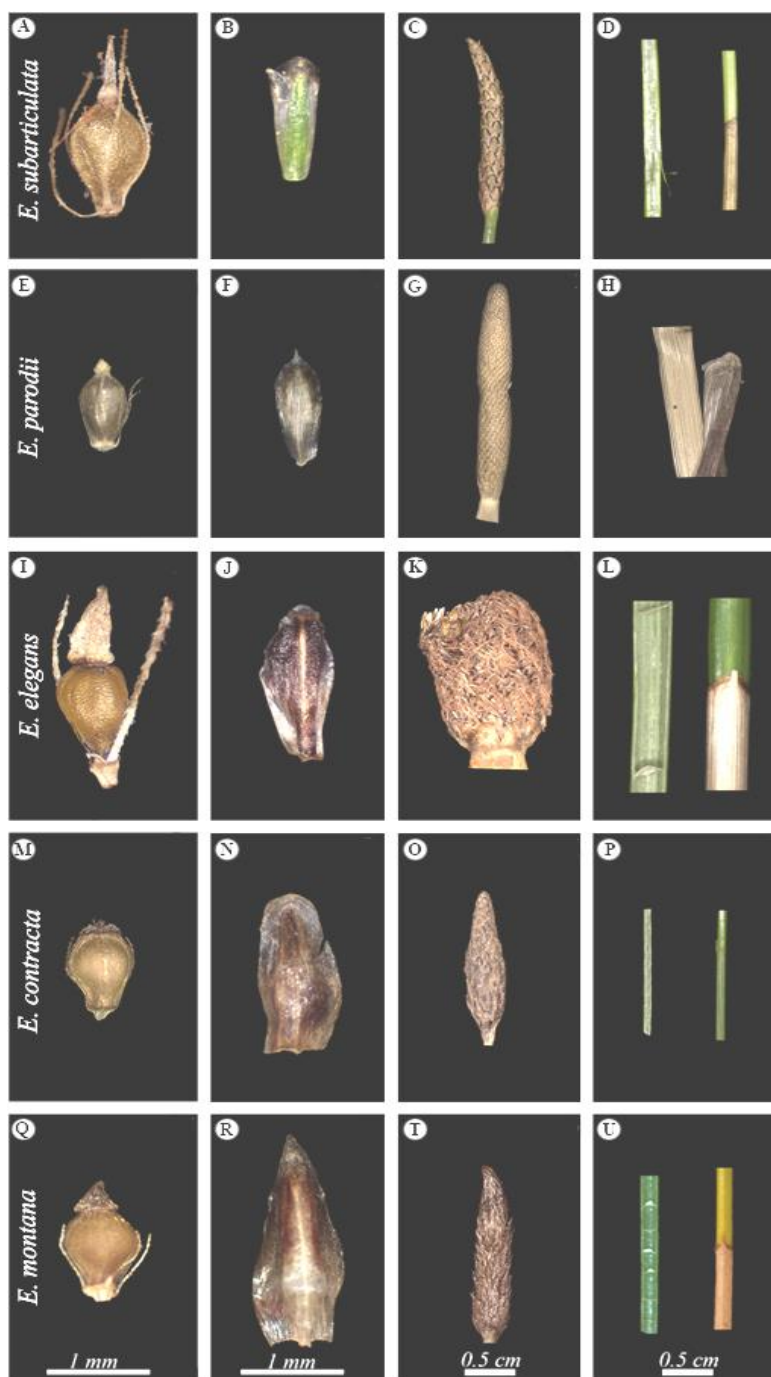


Figura 2. Morfologia das espécies sul-americanas do complexo *E. montana*, com detalhe nas principais características diagnósticas, baseado em Trevisan (2005 e 2009). A, B, C e D – *E. subarticulata*; E, F, G, H – *E. parodii*; I, J, K, L - *E. elegans*; M, N, O e P - *E. contracta*, Q, R, S e T - *E. montana*, seguindo a sequência de aquênio, gluma, espiguetas e colmo respectivamente. Note que o aquênio é distinto em todas as espécies, com algumas sobreposições entre *E. montana* e *E. contracta*. A gluma de *E. parodii* apresenta ápice apiculado, em contraste às demais que são agudas a levemente obtusos. As inflorescências variam em tamanho e número de flores. E os colmos são septados em *E.*

*elegans*, *E. contracta* e *E. montana*, enquanto em *E. subarticulata* e *E. parodii* são esponjosos

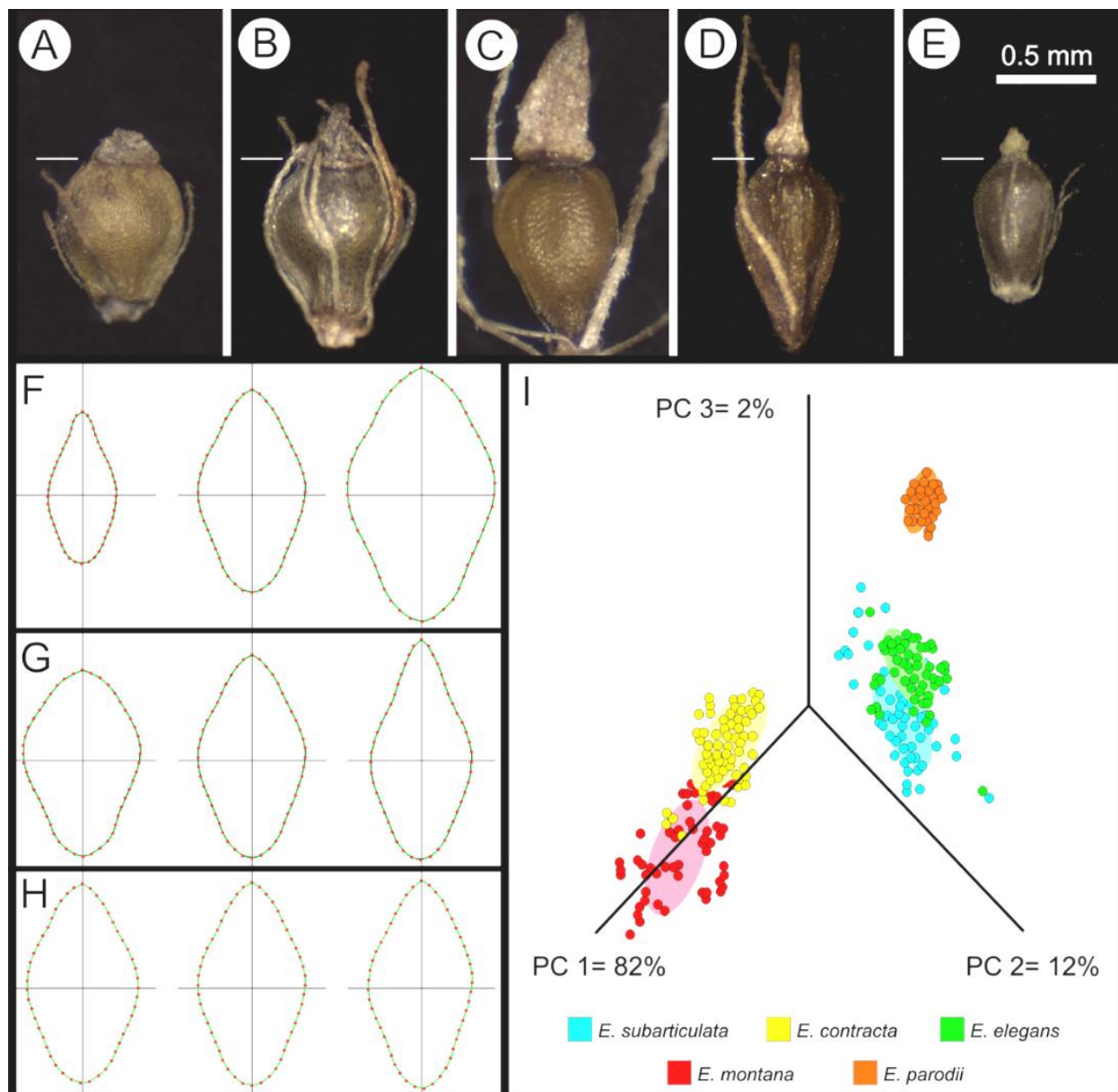


Figura 3. Diferenciação dos contornos dos aquênios estimada no programa LeafAnalyser 2.3.0 com 48 landmarks. Imagens dos aquênios de *E. contracta* (A), *E. montana* (B), *E. elegans* (C), *E. subarticulata* (D) e *E. parodii* (E). (F – H) Contorno médio no centro e desvios nas laterais, gerados pela saída PC1 (F), PC2 (G) e PC3 (H) do programa, que corresponde às diferenças encontradas nas formas dos aquênios. I – Distribuição tridimensional dos desvios padrões dos aquênios ao longo dos eixos PC1, PC2 e PC3. Note que a análise por componentes principais separou claramente *E. parodii* das demais espécies, principalmente pelo tamanho e forma do estilopódio como é demonstrado no desvio do PC1. *Eleocharis montana* e *E. contracta*

apresentaram sobreposição de formas de aquênio, o mesmo foi observado entre *E. elegans* e *E. subarticulata*.

#### *Análise morfológica interpopulacional em E. montana*

Nessa análise foram utilizadas apenas as amostras enquadradas na circunscrição de *E. montana*, devido à grande plasticidade fenotípica apresentada em campo. As medições mostraram um gradiente de variação no tamanho das estruturas morfológicas, entre indivíduos de uma mesma localidade e entre populações (Tab. 2 e Fig. 4). As espiguetas variaram de 0,5 a 2,1 cm (Figs. 4A - 4E e Tab. 2), com valores mínimos similares aos das espiguetas observadas em *E. contracta*, com cerca de 0,5 cm (Figs. 2O e 4E). Em geral, a forma foi ovóide nas espiguetas menores e lanceoladas nas maiores, enquanto as intermediárias variaram entre essas duas formas (Figs. 4A - 4E).

Os colmos apresentaram variação na disposição (espaçamento) dos septos, sendo alguns distribuídos de forma regular (Figs. 4G e 4J) e outros irregulares (Figs. 4F, 4H e 4I). Os diâmetros do colmo variaram de 0,97 mm a 1,73 mm (Tab. 2), e a forma do mucrão dorsal foi desde agudo (Figs. 4L, 4N e 4O) a levemente obtuso (Figs. 4K e 4M). As bainhas apresentaram borda vinácea (Figs. 4L e 4O) a castanho (Figs. 4K, 4M e 4N).

Os aquênios de *E. montana* exibiram coloração de oliváceo (Fig. 4R) a castanho escuro (Fig. 4T), mantendo a forma biconvexa a trígona, medindo de 1,15 mm a 1,39 mm (Tab. 2), incluindo a base do estilopódio, que variou de achatado dorsiventralmente (Figs. 4S e 4T) a piramidal mais longo (Figs. 4P, 4Q e 4R), assim como as glumas, que apresentaram margem hialina diminuta e mais curta (Figs. 4U, 4V e 4W) até outras bem delimitadas e de maior tamanho (Figs. 4X e 4Y) e com ápice de acuminado (Fig. 4Y) a agudo (Figs. 4U, 4V, 4W e 4X). As estruturas de *E. montana* variaram principalmente em relação ao tamanho, especialmente nas espiguetas (~5 a 25 mm) com índice de variância igual a 19,22, seguido do diâmetro do colmo (~0,9 a 2 mm) e da altura da gluma que variou de ~2,0 a 3,0 mm (Tab. 2).

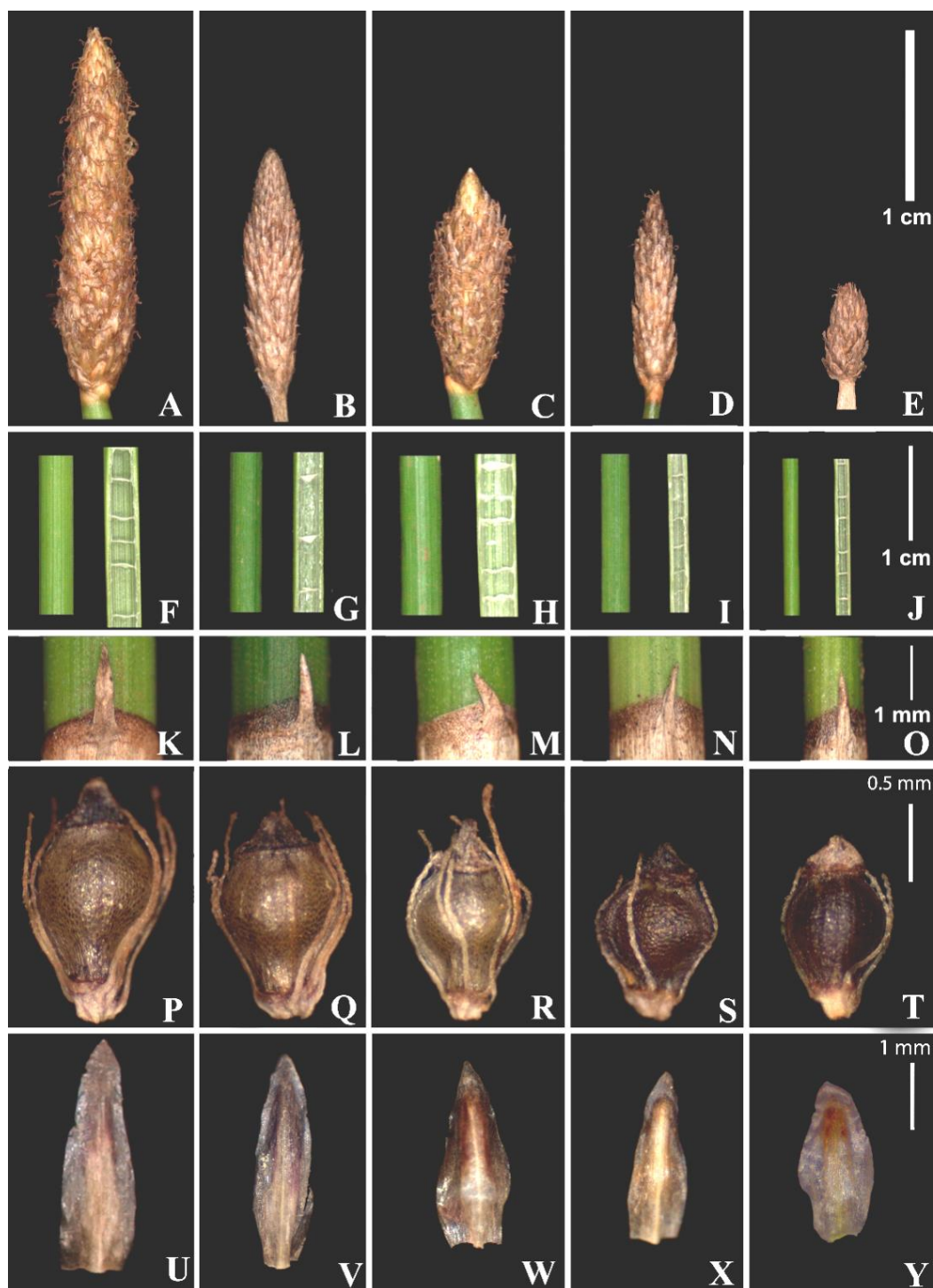


Figura 4. Imagens demonstrando a variação fenotípica de *E. montana*, com detalhes nas estruturas: espiguetas A, B, C, D e E; colmo - F, G, H, I, J; bainha/mucrão - K, L, M, N, O; aquênio - P, Q, R, S, T; e gluma - U, V, W, X e Y. Note que a principal variação foi no tamanho, com destaque para as

inflorescências e número de flores. Note também a irregularidade na disposição dos septos.

Tabela 2. Medições morfológicas das estruturas diagnósticas de *E. montana*.

<b>Estrutura</b>	<b>Média (mm)</b>	<b>Desvio padrão (mm)</b>	<b>Variância</b>
Colmo	1,35	±0,38	0,14
Gluma	2,53	±0,33	0,11
Espigueta	13,44	±4,38	19,22
Fruto	1,27	±0,12	0,01

Cálculo da média, desvio padrão e variância dos colmos, glumas, espiguetas e frutos foram realizados com 10 repetições de 42 indivíduos coletados nos estados de SP, PR, SC e RS.

### *Anatomia*

A análise da anatomia dos colmos mostrou epiderme unisseriada com regiões de fibras esclerenquimáticas. Logo abaixo da epiderme, foi observado um parênquima clorofiliano (Fig. 5, setas brancas), contendo uma ou duas camadas de células paliçádicas. Feixes vasculares foram vistos intercalados com regiões de aerênquima, abaixo do parênquima clorofiliano (Fig. 5, asteriscos). Esses feixes apresentaram componentes típicos de monocotiledôneas como: metafloema, periciclo, metaxilema, lacuna no protoxilema, células parênquimáticas e fibras do esclerênquima. Além disso, duas bainhas foram evidentes ao redor do feixe vascular: uma parenquimatosa mais externa e a bainha do mestoma (correspondente à endoderme) mais interna (Fig. 5, cabeças de setas). As células dessas bainhas apresentaram semelhança morfológica com células do parênquima ou esclerênquima, não possuindo, portanto, cloroplastos em seu citoplasma. Em *E. montana*, *E. contracta* e *E. elegans*, o aerênquima exibiu lacunas regulares (Figs. 5A, 5B e 5C), tanto nas regiões entre os feixes vasculares quanto na região central, formando uma grande cavidade. Em *E. subarticulata*, diferentemente das demais, as lacunas do aerênquima foram irregulares, sem a formação de uma cavidade central (Fig. 5D).

### *Citometria de fluxo e citogenética convencional*

A estimativa dos valores 2C de DNA foi obtida em células somáticas das quais foram calculadas os valores dos complementos monoploides (Cx). Foi feita a leitura de pelo menos 30 mil núcleos por espécie, os quais foram comparados com os valores C de DNA de *Solanum lycopersicum* (Fig. 6). O valor 2C de DNA (CV < 5%) no “complexo *E. montana*” variou de

1,57±0,02 pg em *E. subarticulata* ( $2n = 2x = 6$ ) e 1,57±0,03 pg em *E. parodii* ( $2n = 2x = 10$ ) a 4,75±0,06 pg em *E. montana* com  $2n = 8x = 40$  (Fig. 6), mas os valores monoploides ( $Cx$ ) foram de 0,78 pg, 0,55 pg, 0,69 pg e 0,59 pg em *E. subarticulata*, *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*, respectivamente (Fig. 6). A análise variância (ANOVA) demonstrou diferenças significativas no valor 2C de DNA ( $F_{3,48} = 2068$ ,  $p < 000.1$ ) e no valor  $Cx$  ( $F_{3,48} = 176.1$ ,  $p < 000.1$ ). Para ambos os casos (2C e  $Cx$ ), o Teste de Tukey confirmou que a variação foi significativa entre todos os grupos ( $p < 0,05$ ), exceto entre *E. subarticulata* e *E. parodii* ( $p = 0.99$ ). É importante ressaltar que cariótipo com  $2n = 10$  de *E. parodii* (Fig 7B) acompanha o número básico do subgênero *Eleocharis*, enquanto que  $2n = 6$  de *E. subarticulata* (Fig 7A) foi derivado por simploidia, e que os cariótipos  $2n = 20$  de *E. elegans* e *E. contracta* (Figs. 7D e 7C) e  $2n = 40$  de *E. montana* (Fig. 7E) foram derivados por poliploidia. Esses valores mostram que o aumento no conteúdo de DNA total acompanha o aumento nos níveis de ploidia, com correlação de Pearson de  $R^2 = 0,95$  (Fig. 6).

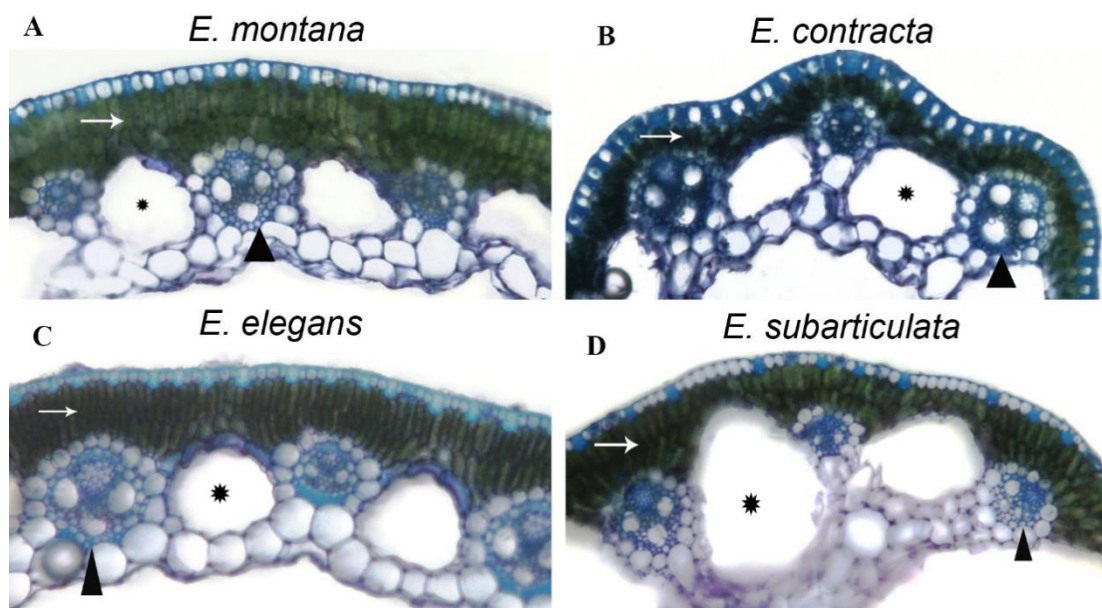


Figura 5. Anatomia do colmo de *E. montana*, *E. contracta*, *E. elegans* e *E. subarticulata* corados com azul de toluidina 0,05%. Setas indicam parênquima clorofiliano, cabeças de setas o feixe vascular e os asteriscos os aerênquimas.

Todas as espécies possuem cromossomos holocêntricos diminuindo de tamanho gradualmente (Figs 7A – 7E). Houve pouca diferença entre o maior e o menor cromossomo de *E. parodii* (Fig. 7B), em comparação com o cariótipo disploide de *E. subarticulata*, onde o par menor correspondeu a 3/4 do maior, com uma diferença superior a 1µm (Fig. 7A). Em *E. elegans* e *E. contracta*, o menor par cromossômico representou 3/4 do maior, mas com diferença menor que 1µm (Figs. 7D e 7C). Em *E. montana*, o maior par foi aproximadamente o dobro do tamanho do menor, variando mais de 1µm (Fig. 7E). A análise cromossômica convencional não mostrou nenhuma característica que indicasse claramente a presença de híbridos, embora houve uma maior similaridade em relação ao tamanho dos cromossomos de *E. montana*, *E. elegans* e *E. contracta* (variando ~1 a 3 µm), em relação a *E. parodii* (~0.5 µm) e *E. subarticulata*, que variou de ~1,5 a 4 µm (Figs. 7A – 7E).

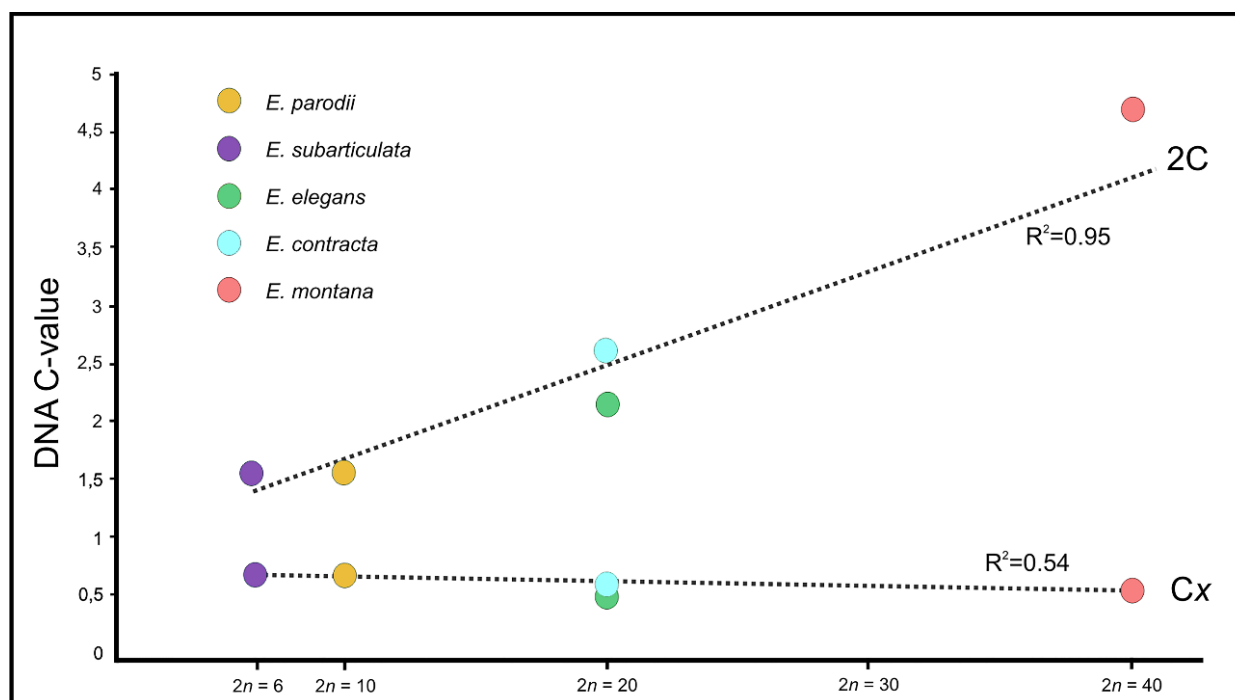


Figura 6. Comparação do conteúdo de DNA entre as espécies sul-americanas do complexo *E. montana* com o valor médio das espécies diploides de *Eleocharis*. Correlação entre número cromossômico e a quantidade de DNA total para *E. subarticulata*, *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*, com valores de DNA total de células somáticas (2C) e quantidade de DNA do complemento monoploide (Cx) em picogramas. Os valores a direita correspondem a correlação de Pearson, com  $R^2=0,95$  para os valores 2C e  $R^2=0,54$  para os valores Cx. Note que os valores de 2C possuem correlação positiva com o aumento da ploidia, enquanto os valores de Cx não demonstraram tal correlação.

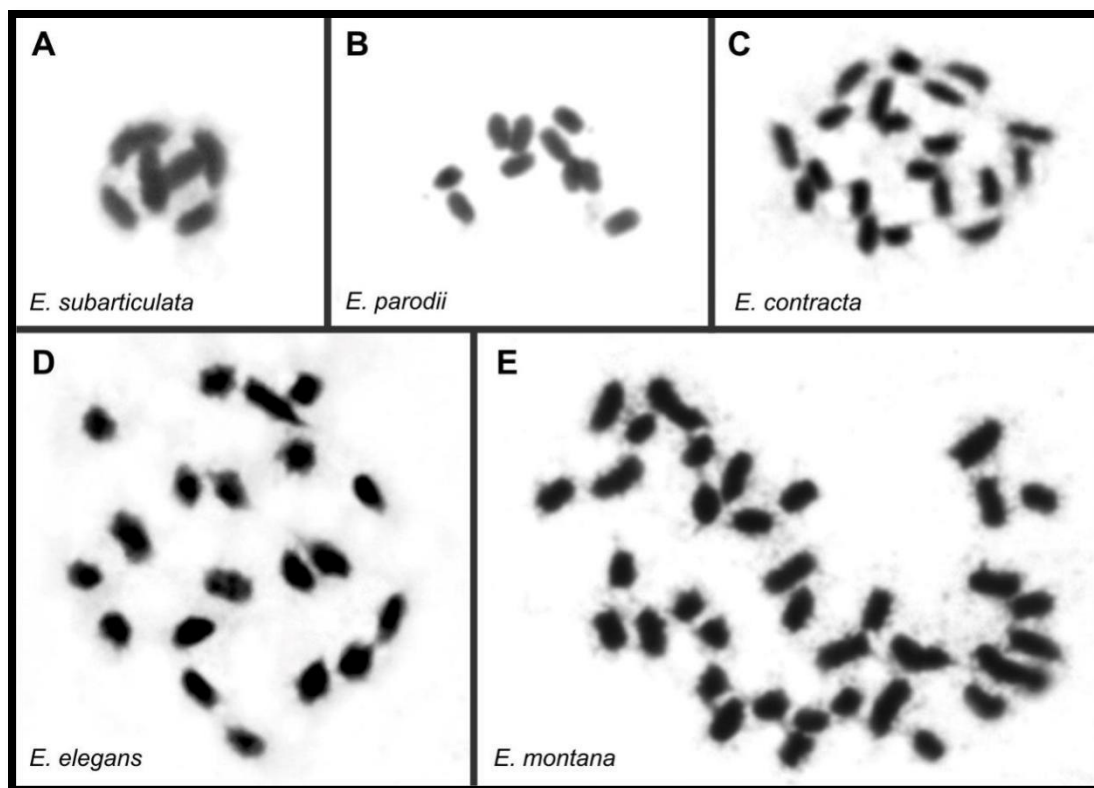


Figura 7. Metáfases e prometáfases mitóticas coradas com Giemsa, mostrando variação no número cromossômico das espécies sul-americanas do complexo *E. montana*. (A) *E. subarticulata*  $2n = 2x = 6$ ; (B) *E. parodii*  $2n = 2x = 10$ ; (C) *E. contracta* com  $2n = 4x = 20$ ; (D) *E. elegans* com  $2n = 4x = 20$  e (E) *E. montana* com  $2n = 8x = 40$ . Barra = 5  $\mu\text{m}$ . Note que todas as espécies possuem cromossomos holocêntricos diminuindo de tamanho gradualmente.

#### Marcadores moleculares e DNAs repetitivos

O sequenciamento genômico de baixa cobertura de *E. elegans*, seguido da montagem utilizando K-mers 41 e 71, resultou em 15.808 sequências maiores que 500 pb, com extensão de 7.507.250 pb e N50 de 886. Após a varredura dessas sequências com o *scritp* SSRIT, foram observados que os oligômeros mais frequentes no conjunto de dados foram: AG/TC com 820 repetições, ATG/TAC com 590 repetições e GA/AC 570 repetições. Além disso, a análise também mostrou que há mais dímeros e trímeros, 87%, do que os demais, 23% (Fig. 8A - 8C). Oligômeros baseados em GA amplificaram com maior sucesso nos genomas alvo, e foram utilizados para a análise de marcadores ISSR e REMAP com *Gypsy* e *Copia*.

A análise comparativa com marcadores moleculares, baseada no oligômero GA, assim como com os *primers* para retrotransposons com LTR (*Gypsy* e *Copia*), gerou um total de 98





Tabela 3. Análise de variância molecular (AMOVA) para 16 indivíduos de *E. montana*, três de *E. contracta*, três de *E. elegans* e cinco de *E. subarticulata* usando ISSR e REMAP.

FV	GL	SQ	QM	%	P
Entre populações	3	250.192	83.397	73%	<0.001
Dentro das populações	23	126.104	5.483	27%	<0.001
Total	26	376.296		100	

FV = fator de variação; GL = grau de liberdade; SQ = soma dos quadrados médios; QM = quadrados médios; % = porcentagem e P = probabilidade.

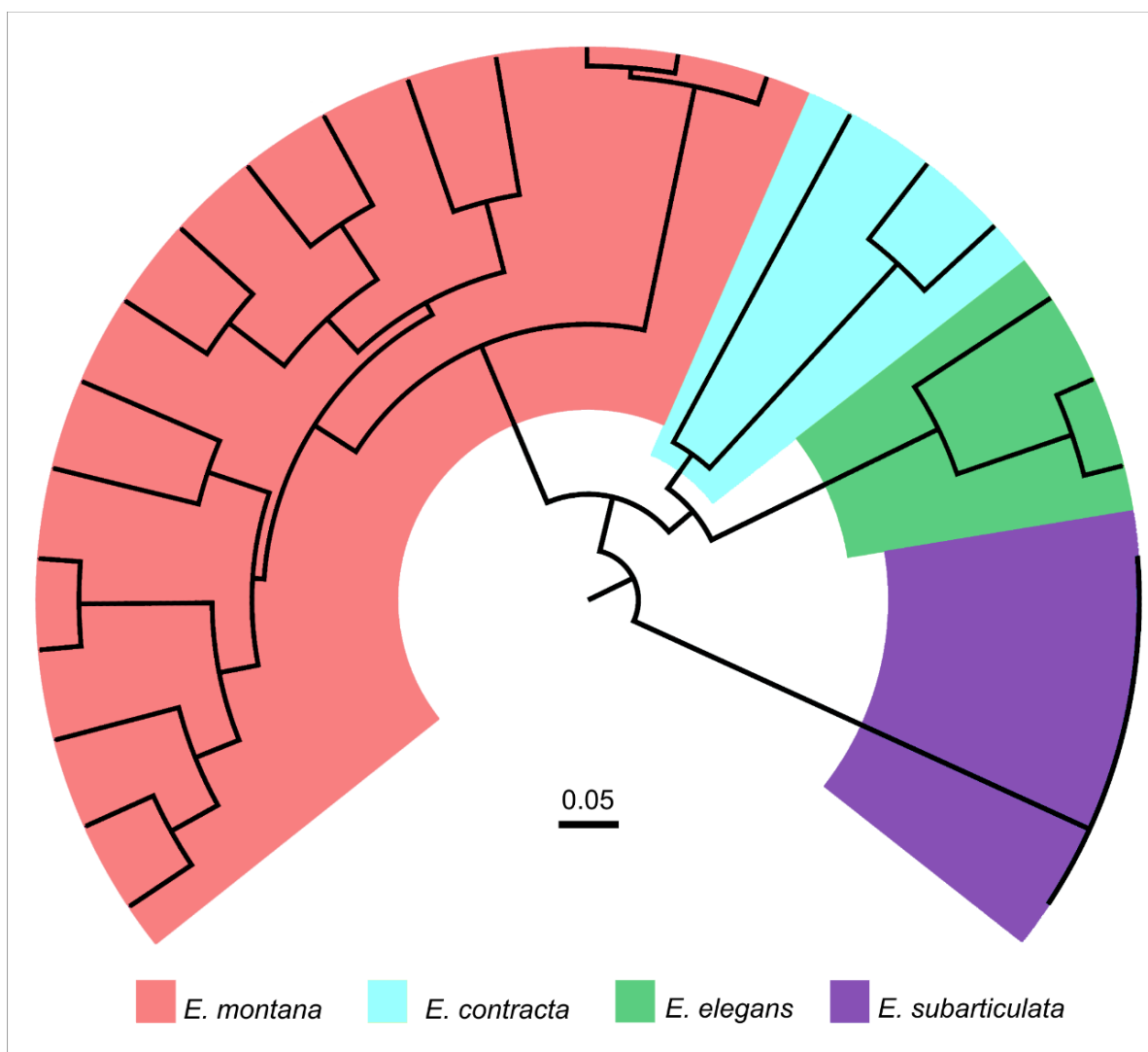


Figura 10. Dendrograma de quatro espécies do complexo *E. montana* feitos a partir de uma análise de similaridade de Jacard, baseado em marcador do tipo ISSR e REMAP.

### Filogenia baseada em sequências de DNAr 5.8S + ITS

A filogenia a partir de sequências de DNAr 5.8S e ITS por análise de Máxima Verossimilhança separou o grupo externo (*E. acutangula*, subgênero *Limnochloa*) do complexo *E. montana* (subgênero *Eleocharis*) (Fig. 11B). Dentro do complexo, houve a separação em dois grupos; um primeiro formado por *E. contracta* e *E. montana* e um segundo com *E. elegans*, *E. parodii* e *E. subarticulata*. Contudo, nesse último clado, *E. elegans* foi alocada como um subclado distinto de *E. parodii* e *E. subarticulata* (Fig. 11B). O alinhamento das sequências (DNAr 5.8S + ITS) resultou em poucas regiões contrastantes entre as cinco espécies sul-americanas do complexo, com resolução insuficiente para separar de maneira precisa *E. contracta* de *E. montana* e também *E. parodii* de *E. subarticulata* (Fig. 11A). Mas o alinhamento com a ferramenta Mauve possibilitou reconhecer as relações de parentesco em três domínios, onde foi possível relacionar: i) *E. parodii*, *E. subarticulata*, *E. elegans* e *E. contracta*, todas distantes de *E. montana* (no trecho de 10 a 50 pb); ii) *E. parodii*, *E. subarticulata* e *E. contracta*, assim como *E. elegans*, *E. contracta* e pouco mais distante *E. montana* (no trecho de 150 a 220 pb) e iii) *E. parodii* e *E. subarticulata* e *E. montana*, ficando um pouco mais distante de *E. elegans* e *E. contracta*, no trecho de 550 a ~600 pb (Fig. 11A).

### Hibridação genômica *in situ*

A sonda genômica de *E. parodii* com  $2n = 10$  utilizada contra os cromossomos de *E. elegans* (Figs. 12 A-C), *E. contracta* (Figs. 12 D-F) e *E. montana* (Figs. 12 G-I) hibridizou em metade do complemento cromossômico de cada espécie, com sinais muito fracos na outra metade. A sonda genômica de *E. elegans* com  $2n = 20$  utilizada contra cromossomos de *E. contracta* com  $2n = 20$  (Figs. 13 A-C) e *E. montana* com  $2n = 40$  (Figs. 13 D-F), também apresentou sinais fortes de hibridização em metade dos cromossomos, e sinais muito fracos na outra metade, em ambas as espécies. A sonda genômica de *E. contracta* ( $2n = 20$ ), utilizada na GISH contra os cromossomos de *E. montana*, hibridizou em todos os cromossomos, de maneira homogênea (Figs. 12 J-L). Isso indica que *E. parodii* e *E. elegans* estão na base do processo de formação de híbridos e poliploides dentro desse complexo. Isso fica mais evidente quando as sondas genômicas de *E. contracta* e *E. montana* foram utilizadas contra os cromossomos de *E. elegans*, pois todos os cromossomos dessa espécie exibiram sinais fortes de hibridização com ambas as sondas (Figs. 13 G-L).

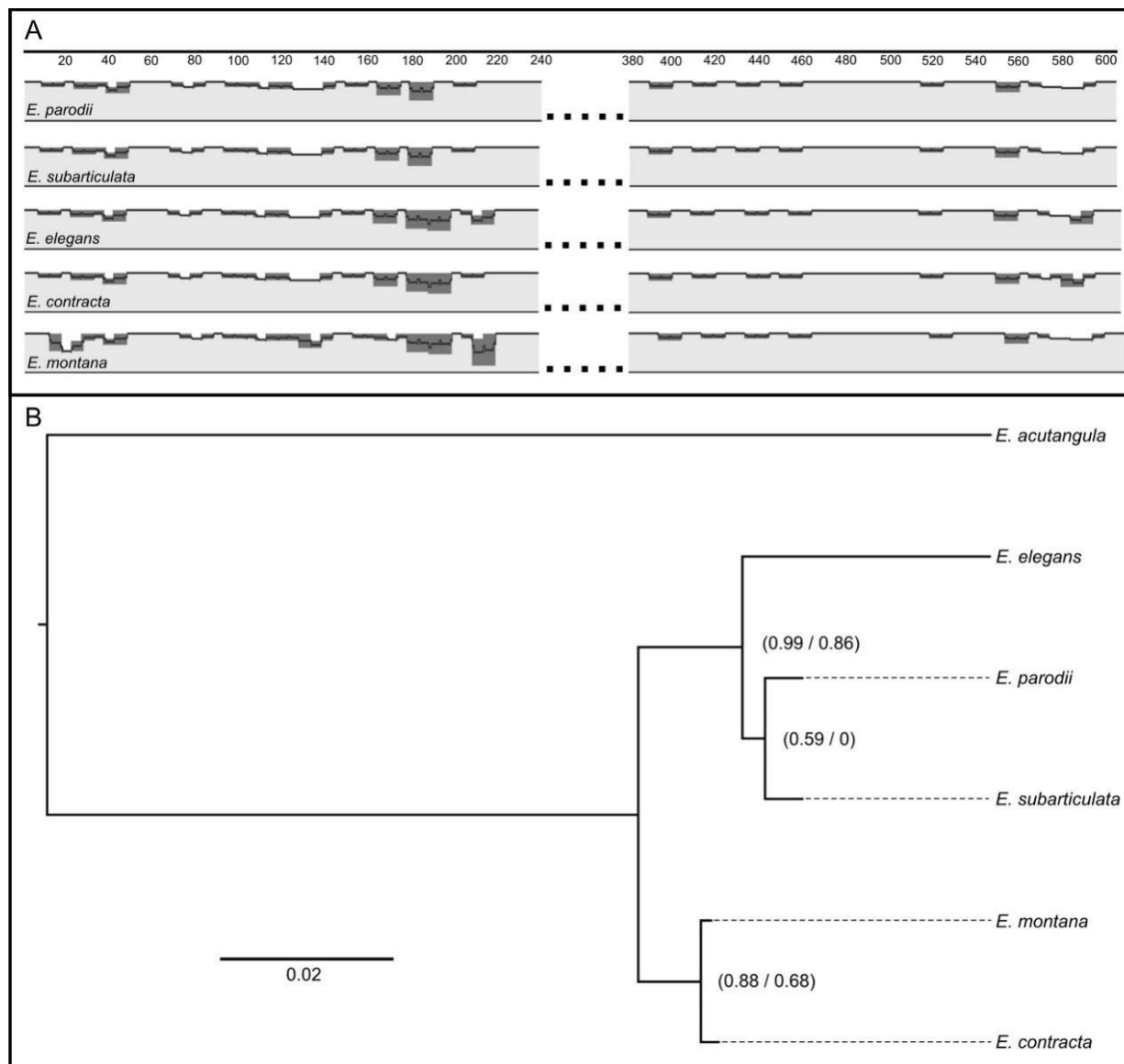


Figura 11. A - Alinhamento das sequências de DNAr 5.8S + ITS das espécies sul-americanas do complexo *E. montana*. Observe que há poucas regiões que diferenciam as espécies. B - Filogenia a partir de sequências de DNAr 5.8S + ITS por análise de Máxima Verossimilhança. Note que não houve a separação de *E. paroddi* e *E. subarticulata*, nem de *E. contracta* e *E. montana*. Os dois valores entre parênteses representam as análises Bayesiana e de Máxima Verossimilhança.

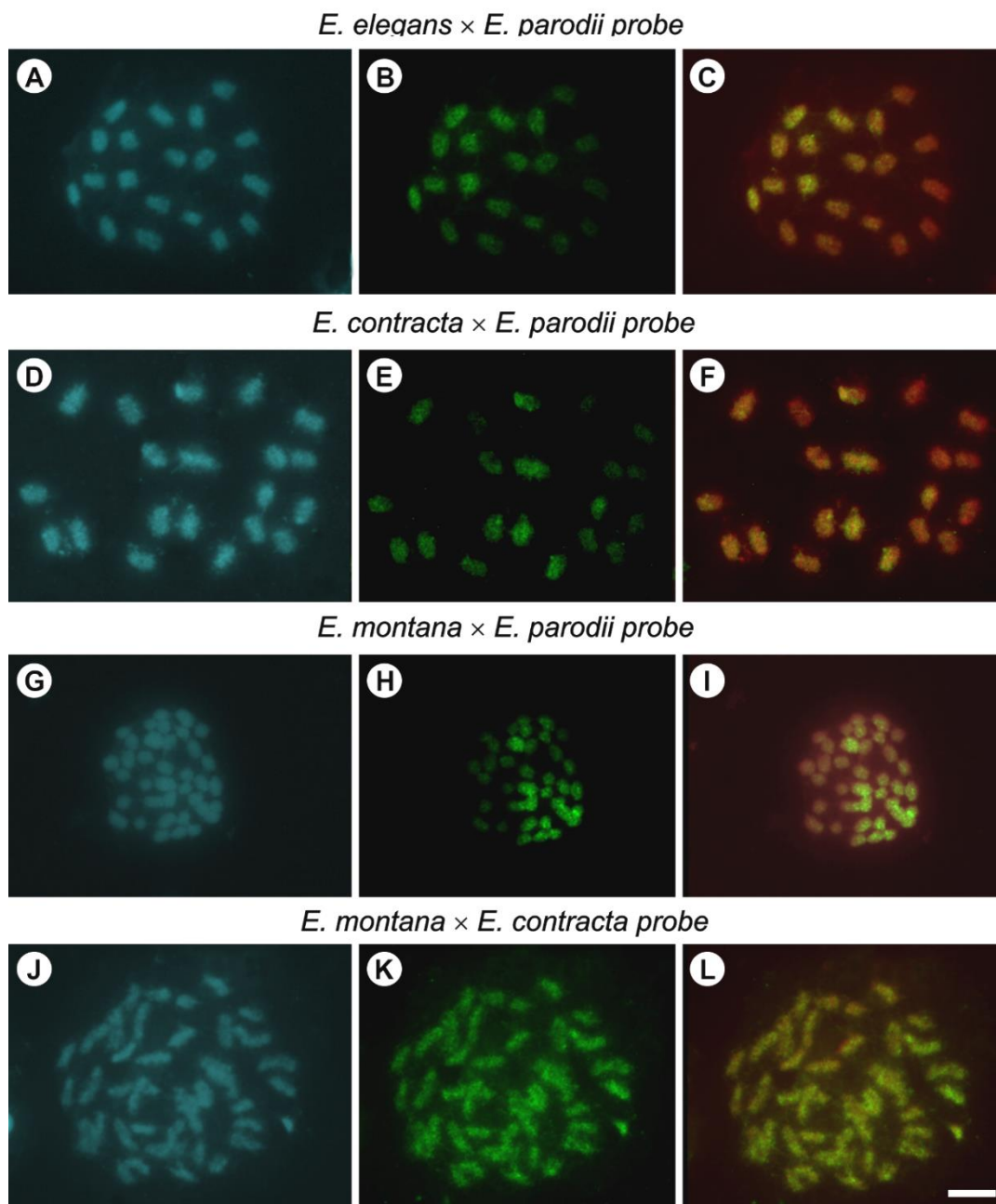


Figura 12. Hibridização genômica *in situ* (GISH) usando cromossomos mitóticos, com cromossomos corados com DAPI (azul), FITC (verde) e pseudo-coloração do DAPI em vermelho. (A, B e C) GISH utilizando sonda de *E. parodii* em cromossomos de *E. elegans*; (D, E e F) GISH utilizando sonda de *E. parodii* em cromossomos de *E. contracta*; (G, H e I) GISH utilizando sonda de *E. parodii* em cromossomos de *E. montana* e (J, K e L) GISH utilizando sonda de *E. contracta* em cromossomos de *E. montana*. Note que em *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*, quando submetidos a GISH com sondas de *E. parodii*, metade dos cromossomos apresentaram sinais de hibridização mais fortes, e que em *E. montana*, quando submetidos a sonda de *E. contracta*, todos os cromossomos foram hibridizados.

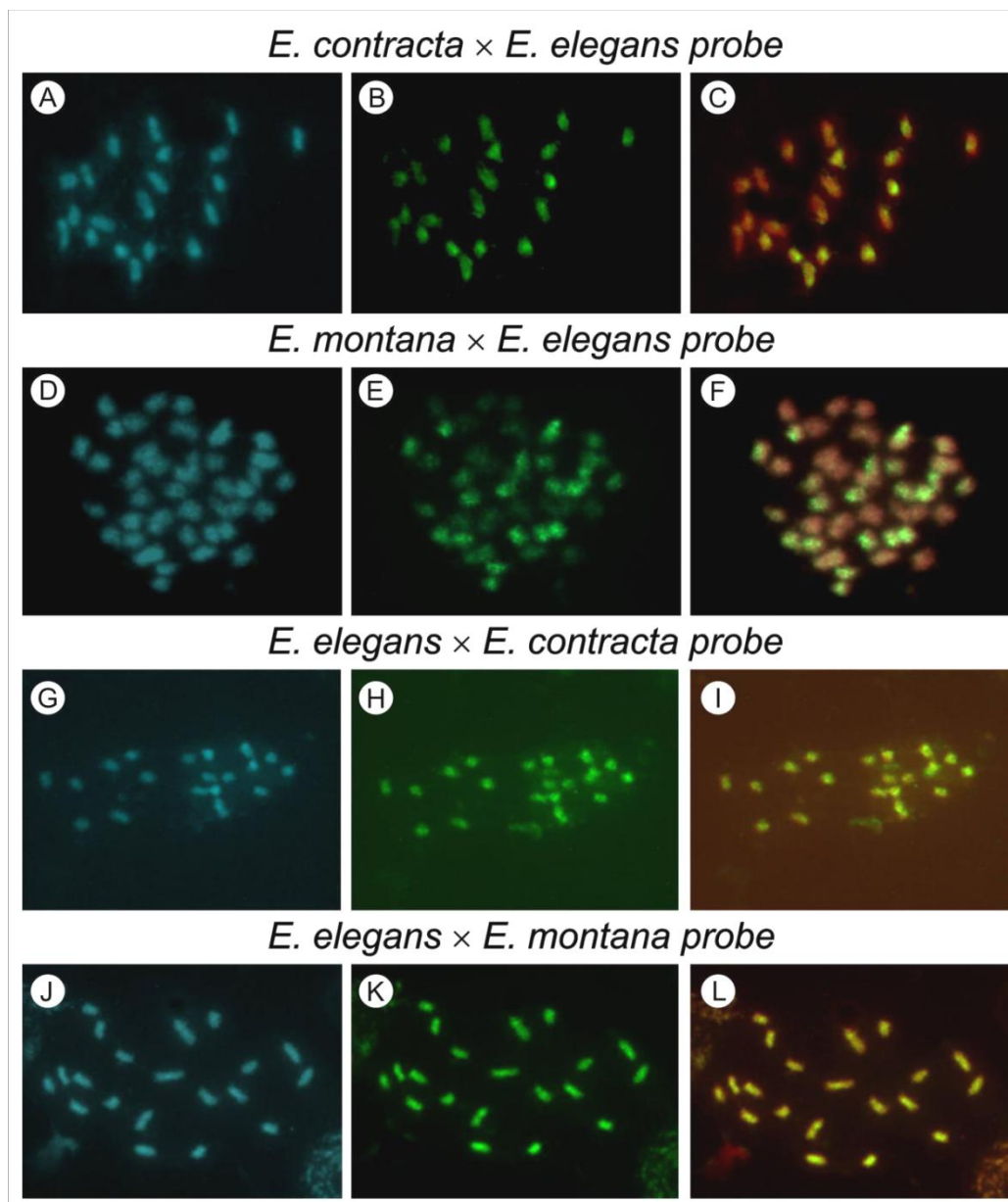


Figura 13. Hibridização genômica *in situ* (GISH) usando cromossomos mitóticos, com cromossomos corados com DAPI (azul), FITC (verde) e pseudo-coloração do DAPI em vermelho. (A, B e C) GISH utilizando sonda de *E. elegans* em cromossomos de *E. contracta*; (D, E e F) GISH utilizando sonda de *E. montana* em cromossomos de *E. elegans*; (G, H e I) GISH utilizando sonda de *E. elegans* em cromossomos de *E. contracta* e (J, K e L) GISH utilizando sonda de *E. montana* em cromossomos de *E. elegans*. Note que em *E. contracta* e *E. montana*, quando submetidos a GISH com sondas de *E. elegans*, metade dos cromossomos apresentaram sinais de hibridização mais fortes, e que em *E. elegans*, quando submetidos a sonda de *E. contracta* e *E. montana*, todos os cromossomos foram hibridizados.

## DISCUSSÃO

### *Morfologia, morfometria e anatomia*

O gênero *Eleocharis* é um dos maiores de Cyperaceae (Govaerts et al., 2015) e possui características morfológicas que se sobrepõem em tamanho e forma, entre populações e espécies (González-Elizondo e Peterson, 1997; Trevisan, 2009). Essa sobreposição de caracteres diagnósticos muitas vezes dificulta a delimitação das espécies, levando os taxonomistas a organizar grupos de espécies intimamente próximas em complexos, como aconteceu em *Eleocharis viridans*, *E. niederleinii* e *E. ramboana* (Da Silva et al., 2017) e em *E. montana*, *E. contracta*, *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii* (Roalson et al., 2010). De acordo com a classificação proposta por González-Elizondo e Peterson (1997), as espécies do complexo *E. montana* podem ainda ser agrupadas em duas subséries, separadas principalmente pelo formato do ápice da bainha, o qual é truncado e com mucrão desenvolvido em *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana* (subsérie *Truncatae*), e sem mucrão ou reduzido, em *E. subarticulata* e *E. parodii* (subsérie *Eleocharis*), considerando apenas as espécies sul-americanas.

Além das características morfológicas de *Eleocharis*, outras micro-morfológicas e anatômicas também podem sustentar a delimitação de espécies em complexos, como a disposição e o tamanho das células nos tecidos do colmo. A anatomia C<sub>3</sub> do colmo foi similar entre as espécies do complexo *E. montana*, sem características espécie-específicas úteis ao diagnóstico taxonômico, exceto pelas lacunas regulares no aerênquima de *E. montana*, *E. contracta* e *E. elegans*, quando formando septos. Embora existam diferenças anatômicas nas estratégias C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub> dentro do gênero (Ueno et al., 1989), de maneira geral, a anatomia do colmo é relativamente conservada, como reportado também para *E. palustris*, *E. interstincta* e *E. vivipara* (Eiten 1969; Ueno et al., 1989; Rocha e Martins, 2011; Krähmer, 2016).

A análise de componentes principais associado à morfologia do aquênio sugere uma delimitação clara entre *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii*, principalmente devido aos contrastes no tamanho e forma do estilopódio. Quando essas características são interpretadas conjuntamente com a forma da espiguetta, bainha e colmo, fica claro que *E. elegans* se relaciona mais com *E. contracta* e *E. montana* do que com *E. subarticulata* e *E. parodii*, mas essas relações foram poucos exploradas nos estudos taxonômicos do grupo (Trevisan, 2009). O que

chamou atenção foi que houve sobreposição de algumas características morfológicas e anatômicas entre *E. elegans*, *E. subarticulata* e *E. parodii*, e entre *E. contracta* e *E. montana*, mas nessas duas últimas houve diferenças marcantes apenas no tamanho de suas estruturas. Essa variação no tamanho já havia sido mencionada por Trevisan (2009). A mistura de características morfológicas pode servir como parâmetro para interpretar a origem de híbridos e isso foi reportado em estudos com híbridos artificiais no gênero *Tolpis* da família Asteraceae, inclusive com híbridos apresentam alta plasticidade fenotípica, como foi observado inter e intrapopulações de *E. montana* por análises morfométricas e morfológicas. Nesse contexto, as sobreposições e variações de características morfológicas encontradas nessas cinco espécies de *Eleocharis* podem ser um bom indicativo da atuação do processo de hibridização na evolução do complexo *E. montana*, pois as divergências em traços fenotípicos diagnósticos detectados por análises morfométricas conduzem a essa interpretação.

#### *Conteúdo de DNA e cariótipos*

Variações no conteúdo de DNA em plantas ocorrem devido a rearranjos cromossômicos numéricos e estruturais, sendo os principais responsáveis a poliploidia e o acúmulo ou eliminação de DNA de natureza repetitiva (Bennetzen, 2000; Heslop-Harrison e Schwarzacher, 2011; Tenaillon et al., 2011). As espécies do complexo *E. montana* também seguiram essa tendência geral em plantas, já que os valores  $2C$  e  $Cx$  foram similares no diploide *E. parodii* ( $2n = 10$ ) e no disploide *E. subarticulata* ( $2n = 6$ ), comparativamente aos genomas dos tetraploides de *E. elegans* e *E. contracta* (ambos com  $2n = 20$ ) e no octaploide *E. montana* ( $2n = 40$ ). Em outro estudo sobre o conteúdo de DNA envolvendo sete espécies do subgênero *Eleocharis*, Souza et al. (2018) mostraram que a variação no subgênero *Eleocharis* ocorre principalmente pela poliploidia, sendo as disploidias e as flutuações na quantidade de retrotransposons considerados secundários. Quando ampliamos essa comparação para todo o gênero *Eleocharis*, a diferença alcança cerca de  $21\times$ , de 0.84 a 18 pg (Zedek et al., 2010), sendo muito maior do que a encontrada em *Carex* (0,3 a 2,3 pg), *Eriophorum* (0.75 a 1,3 pg), *Scirpus* (0.8 a 1.0 pg) e *Cyperus*, a qual foi de 0.9 a 2.75 pg (Bennett e Leitch, 2012), nesses gêneros predomina a aneuploidia (Roalson, 2008).

Estudos citogenéticos feitos em *Eleocharis* reportam variações numéricas decorrentes de disploidia, com registros de redução do número cromossômico de  $2n = 10$  para  $2n = 6$  em *E.*

*subarticulata* (Da Silva et al., 2005) e de  $2n = 10$  para  $2n = 8, 7$  e  $6$  em *E. maculosa* (Da Silva et al., 2008) por quebras (agmatoploidia) e fusões (simploidia). Cariótipos gerados por disploidia foram reportados também em outros gêneros de Cyperaceae, como *Carex* (Hipp et al., 2009) e *Rhynchospora* (Arguelho et al., 2012; Michelan et al., 2012). Variações poliploides baseados em  $x = 5$  (número básico inicialmente sugerido por Löve et al. (1957) e posteriormente mencionado para *Fimbristylis* (Nijalingappa, 1975), *Rhynchospora* (Luceño et al., 1998; Vanzela et al., 2000) e *Eleocharis* (Da Silva et al., 2008, 2010a), foram observadas de modo intraespecífico em *Eleocharis acuta*,  $2n = 20$  e  $40$  (Briggs, 1970), *E. atropurpurea*  $2n = 10$  e  $20$  (Sanyal e Sharma, 1972) e *E. geniculata*  $2n = 10$  e  $20$  (Tuspule, 1966; Sharma e Sarkar, 1968), e de modo interespecífico em *E. minuta* e *E. montevidenses*,  $n = 10$  (Briggs, 1970; Harms, 1964), *E. uniglumis* com  $n = 20$  e  $25$  (Davies, 1956; Thiebaud, 1970), até casos menos frequentes como *E. dulcis* com  $2n > 200$  (Rath e Patnaik, 1972). Variações similares também foram descritas para outros gêneros da família, como *Rhynchospora* com  $n = 5, 9, 10$  e  $18$  e *Schoenoplectus* com  $n = 19, 21$  e  $39$  (revisado por Roalson, 2008). Todas essas variações demonstram que em alguns clados de Cyperaceae a diferenciação dos cariótipos se dá predominantemente por quebras e fusões (veja *Carex*, Hipp et al., 2009), enquanto que em outros a poliploidia é mais importante, como em *Eleocharis*.

Assim como já reportado para muitas espécies de Cyperaceae (Håkansson 1954; Melters et al., 2012), os cromossomos do complexo *E. montana* são holocêntricos, sem qualquer evidência de constrições primárias. Essa característica está relacionada a uma maior tolerância a eventos de quebras e fusões, uma vez que, quando um cromossomo holocêntrico é fragmentado e fusionado, os fragmentos gerados retêm atividade cinética e segrega normalmente (Håkansson, 1954; Vanzela e Colaço, 2002). Em geral, rearranjos cromossômicos podem desestabilizar genomas, levando a estresses e atividade diferencial de elementos repetitivos, o que poderia provocar flutuações nos tamanhos dos genomas (Bures e Zedek, 2014). Contudo, nossos dados de citometria de fluxo associados às características cariotípicas mostraram situações divergentes em relação a espécie disploide, *E. subarticulata* ( $2n = 6$ ), na qual houve manutenção dos valores  $2C$  e  $Cx$  em comparação ao diploide com  $2n = 10$ , diferentemente do que foi encontrado por Souza et al. (2018) no disploide *E. maculosa* ( $2n = 6$ ), o qual mostrou diminuição no valor  $C$  de DNA em relação ao diploide *E. parodii* com  $2n = 10$  da mesma espécie. Isso sugere que pode ou não haver variações nos valores  $2C$  e  $Cx$  em função da simploidia. Quando comparamos os valores nos poliploides, tanto em nosso trabalho quanto no de Souza et al. (2018), os valores de  $2C$  e  $Cx$

flutuaram de maneira mais marcante, com aumento de 2C e diminuição de Cx, em relação aos níveis de ploidia menores.

Embora a forma cromossômica seja a mesma, dada a ausência de constrição primária, foram observadas variações de tamanho cromossômico entre e dentro dos cariótipos. Essa variação foi levemente gradual nos diploides e tetraploides, irregular no disploide (provavelmente decorrente das quebras e fusões) e bem acentuada no octaploide *E. montana*. A diminuição gradual no tamanho dos cromossomos é marcante no gênero *Eleocharis*, mesmo considerando o subgênero *Limnochloa*, onde as espécies apresentam cariótipos numerosos e com cromossomos muito pequenos, quando comparado aos outros subgêneros (Da Silva et al., 2010a). Isso também foi observado em outros gêneros da família, como *Rhynchospora* (Luceño et al., 1998). De forma geral, o complexo *E. montana* possui uma organização cariotípica que acompanha o perfil do subgênero *Eleocharis*, exceto por *E. ramboana*, *E. viridans* e *E. niederleinii* da série *Tenuissimae* (C.B. Clarke) do mesmo subgênero, já que essas três espécies formam um complexo de híbridos associados à poliploidia e disploidia e com cariótipos evidentemente assimétricos (veja Da Silva et al., 2017). Em relação ao complexo *E. montana*, o tamanho dos cromossomos não foi suficiente para sugerir relações de hibridização, como observamos na análise morfológica.

### *Filogenia e marcadores moleculares*

Estudos filogenéticos baseados em sequências de DNA (DNAr, DNAcP e DNAmT) foram realizados para diversas famílias de angiospermas (Chase et al., 2016), e sempre contribuíram com a reorganização dos gêneros, como por exemplo em *Betula*, Betulaceae (Wang et al., 2016) e *Dupontiaopsis*, Poaceae (Soreng et al., 2015). Embora consistentes em muitos casos, a ocorrência de mecanismos genéticos e moleculares como duplicações e abrigo genômico de pseudogenes, podem gerar sequências parálogas com potencial para confundir a reconstrução filogenética de maneira mais clara (Alvarez e Wendel, 2003; Feliner e Rosselló, 2007). Vale ressaltar que cerca de 30-70% das espécies vegetais tem origem poliploide (Masterson, 1994). A filogenia de *Eleocharis* baseada em sequências de DNAr (5.8S + ITS) e DNA plastidial (trnC-ycf6 e ycf6-psbM) formou grupos monofiléticos para os subgêneros *Limnochoa* e *Scirpidium*, com espécies do subgênero *Eleocharis* distribuídas por toda filogenia (Roalson et al., 2010). Nossa reavaliação filogenética, baseada nas mesmas sequências de 5.8S DNAr+ITS, e utilizando *E. acutangula* (*Limnochloa*) como grupo externo, sustentou a aproximação das espécies sul-

americanas do complexo *E. montana*, como proposto anteriormente por Roalson et al. (2010). A análise conjunta dos dados de morfologia, anatomia, citometria de fluxo e citogenética, melhorou a resolução e produziu novos indícios de possíveis híbridos. Essa análise colocou *E. parodii* na base do grupo, por ser diploide, aproximando-o de *E. elegans* na filogenia, concordando também com o alinhamento detalhado pela ferramenta Mauve.

Os resultados de marcadores ISSR e REMAP separaram *E. montana*, *E. contracta*, *E. elegans* e *E. subarticulata*, mantendo essa última espécie mais distante. Essa separação concordou com os resultados das outras ferramentas, exceto pela filogenia, provavelmente conflituosa por serem espécies poliploides com múltiplas cópias de genes. A separação de *E. subarticulata* acompanha os dados cariotípicos, já que essa espécie apresenta  $2n = 6$ , com pareamento meiótico em anel (Da Silva et al., 2005), o que provavelmente impossibilita cruzamentos interespecíficos. Do ponto de vista genômico, os marcadores utilizados aqui são bem mais abrangentes do que o DNAr, já que eles envolvem microssatélites e retrotransposons amplamente distribuídos nos genomas como sugerido por Poczai et al. (2013). Esses marcadores moleculares foram utilizados de modo eficiente em estudos de identificação de cultivares de arroz e subespécies de trigo (Branco et al., 2007; Carvalho et al., 2012), e são considerados úteis para diferenciação infragenérica (Poczai et al., 2013). De uma maneira geral, os dados genéticos e morfológicos demonstram o importante papel da hibridização e da poliploidia na especiação e diversidade genômica no complexo *E. montana*.

### *GISH e hibridização*

A técnica de hibridização genômica *in situ* (GISH) possibilitou reconhecer as relações genéticas e a hibridização natural no complexo *E. montana*, estando *E. parodii* com  $2n = 10$  na base do processo evolutivo desse grupo, já que seu genoma foi detectado nos poliploides *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*. Essa técnica foi utilizada com sucesso para detectar híbridos em vários grupos vegetais, como por exemplo em Alliaceae (Friesen et al., 1997), Solanaceae (Chase et al., 2003), Liliaceae (Marasek et al., 2004) e Leguminosae (Marques et al., 2018). Em Cyperaceae, a GISH foi aplicada para reconhecer o papel da hibridização seguida de poliploidia e disploidia na série *Tenuissimae*, no complexo *E. viridans*, *E. niederleinii* e *E. ramboana* (Da Silva et al., 2017). Especificamente para o complexo *E. montana*, a GISH foi conduzida porque

houve evidências morfológicas e genéticas prévias e, nesse caso, todas corroboraram. Além dos casos mencionados, há registros de híbridos entre *E. compressa* x *E. erythropoda*, também do subgênero *Eleocharis* (Catling, 1994), assim como entre *E. cellulosa* x *E. interstincta* do subgênero *Limnochloa* (Kosnar et al., 2010), porém sem a aplicação de marcadores moleculares ou GISH. Híbridos também foram reportados em outros gêneros de Cyperaceae como *Carex* (Catling et al., 1989), *Schoenoplectus* (Fay et al., 2003) e *Scirpus* (Yang et al., 2009). Registros na literatura demonstram que a hibridização tem contribuído extensivamente para a diversidade de angiospermas (revisado por Soltis e Soltis, 2009). Além disso, espécies híbridas e poliploides possuem uma tendência de irradiação para novos habitats e isso pode ter efeitos de longo alcance e imprevisos nesses locais, principalmente considerando a interação com espécies raras e pouco abundantes (Soltis e Soltis, 2009).

A presença do genoma de *E. parodii* nos outros genomas sugere que, provavelmente, essa espécie participou da formação tanto de *E. elegans* quanto de *E. contracta* (híbridos tetraploides), de maneira independente. Posteriormente, *E. contracta* (tetraploide) sofreu poliploidia dando origem a *E. montana* (octaploide) possivelmente por endoreduplicação ou pela fecundação de gametas não reduzidos. Nesse caso, *E. montana* poderia ser considerada um citótipo de *E. contracta*. *Eleocharis subarticulata* aparece mais distante dos poliploides e mais próxima de *E. parodii*, considerando todas as análises feitas nesse estudo. No entanto, essa espécie é disploide com número reduzido decorrente de fusões. Diante desse cariótipo, das diferenças morfo-anatômicas e pelo fato de formas diploides não terem sido encontradas, é possível que *E. subarticulata* não seja o outro genoma parental dos híbridos e poliploides do complexo, mas experimentos de GISH com sonda de *E. subarticulata* ainda estão sendo conduzidos. Como espécies de *Eleocharis* foram exaustivamente coletadas na região Sul da América do Sul, as possibilidades para ausência do outro parental do complexo *E. montana* são: i) a espécie é muito rara, ou ii) a espécie foi extinta, ou iii) pode ser uma das espécies americanas do clado, ou iv) a espécie pertence a outro clado não amostrado aqui. Segundo Roalson et al. (2010), há uma íntima relação entre *E. ravenelii* (América Central), *E. contracta* e *E. montana*, contudo *E. ravenelii* foi coletada apenas duas vezes na natureza no ano de 1890 (WCSP, 2014). Pela descrição dessa espécie, ela se enquadra na circunscrição das formas menores de *E. montana*, já que *E. contracta* se restringe ao Sul da América do Sul.

A poliploidia é frequente em *Eleocharis*, assim como em muitas Cyperaceae (Roalson, 2008), mas foram poucos os casos conclusivos que demonstraram quando houve autopoliploidia ou alopolidiploidia. De uma maneira geral, as suspeitas ocorrem em função do vigor das espécies e da capacidade de invasão natural em habitats diferentes (Parisod et al., 2009, Soltis e Soltis, 2009). O que nos chamou a atenção é que *E. parodii*, *E. subarticulata* e *E. contracta* têm uma distribuição muito restrita (Sul da América do Sul), com poucas populações e poucos indivíduos, formando nessa área uma zona de hibridização, onde também ocorrem *E. elegans* e *E. montana*, sendo *E. montana* a mais amplamente distribuída (Trevisan, 2009; WCSP, 2014). Contudo, apenas essas duas últimas espécies irradiaram até a América do Norte e, comparando com *E. contracta*, também tetraploide e com um dos parentais em comum, não fica claro por que essa espécie não teve sucesso na conquista de novos habitats, como ocorreu com *E. elegans* e *E. montana*.

## CONCLUSÕES

- 1) As espécies sul-americanas do complexo *E. montana* apresentam circunscrição clara na morfologia, exceto *E. contracta* e seu derivado octaploide *E. montana*, que divergem apenas em tamanho.
- 2) A organização do aerênquima regular em *E. montana*, *E. contracta* e *E. elegans* reforça a proximidade dessas espécies, enquanto *E. subarticulata* apresenta aerênquima irregular.
- 3) O conteúdo de DNA varia nos poliploides em relação ao diploide, sem diferença significativa considerando o disploide *E. subarticulata*.
- 4) A poliploidia predomina no complexo *E. montana*, assim como a presença de cromossomos reduzindo gradualmente de tamanho. Exceto no disploide *E. subarticulata* que apresenta uma redução irregular no tamanho dos cromossomos decorrente das fusões.
- 5) Os marcadores genéticos ISSR e REMAP concordaram com os dados de morfo-anatomia, mas diferiram um pouco da filogenia baseada em DNAr, já que aproximou *E. elegans*, *E. contracta* e *E. montana*.
- 6) A GISH demonstrou a formação de híbridos tetraploides (*E. elegans* e *E. contracta*), sendo um dos genomas parentais conhecido (*E. parodii*) e sustentou um ciclo a mais de poliploidia na formação de *E. montana* a partir de *E. contracta*.
- 7) O Sul da América do Sul é a zona de hibridização e o centro de origem do complexo *E. montana* e somente *E. elegans* (tetraploide) e *E. montana* (octaploide) tiveram sucesso na irradiação até as Américas Central e do Norte.

## **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

- ÁLVAREZ, Inés; WENDEL, Jonathan F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003.
- ARGUELHO, E et al. New chromosome counts in Brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Caryologia**, v. 65, n. 2, p. 140-146, 2012.
- BENNETT, M. D.; LEITCH, I. J. Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012). 2012.
- BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 1, p. 251-269, 2000.
- BRANCO, C. J. S. et al. IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 2, p. 107-113, 2007.
- BRIGGS, B. G. Chromosome numbers in some Australian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Contr. New South Wales Natl. Herb.** 4: 130–136. 1970.
- BURES, P. A high polyploid *Eleocharis uniglumis* SL (Cyperaceae) from Central and Southeastern Europe. **Folia Geobotanica**, v. 33, n. 4, p. 429-439, 1998.
- BURES, P.; ZEDEK, František. Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. **Evolution**, v. 68, n. 8, p. 2412-2420, 2014.
- CARVALHO, A.; GUEDES-PINTO, H.; LIMA-BRITO, J. E. Genetic diversity in old Portuguese durum wheat cultivars assessed by retrotransposon-based markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 3, p. 578-589, 2012.
- CATLING, P. M.; REZNICEK, A. A.; DENFORD, K. *Carex lacustris* × *C. trichocarpa* (Cyperaceae), a new natural hybrid. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 3, p. 790-795, 1989.
- CATLING, P. M. *Eleocharis compressa* × *Eleocharis erythropoda*, a new natural hybrid spike rush from Ontario. **Canadian journal of botany**, v. 72, n. 6, p. 837-842, 1994.
- CHASE, M. W. et al. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). **Annals of Botany** 92, 107–127, 2003.
- CHASE, M. W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.
- 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.

DA SILVA, C. R. M. et al. Ornamentation of achene silica walls and its contribution to the systematics of *Eleocharis* (Cyperaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 2, p. 391-398, 2011.

DA SILVA, C. R. M. et al. Genome differentiation, natural hybridisation and taxonomic relationships among *Eleocharis viridans*, *E. niederleinii* and *E. ramboana* (Cyperaceae). **Australian Systematic Botany**, v. 30, n. 2, p. 183-195, 2017.

DAR, T. H.; RAINA, S. N.; GOEL, S. Cytogenetic and molecular evidences revealing genomic changes after autopolyploidization: a case study of synthetic autotetraploid *Phlox drummondii* hook. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 3, p. 641-650, 2017.

DAVIES, E. W. Some new chromosome numbers in the Cyperaceae. **Watsonia** 3: 242–243, 1956.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2233-2244, 2007.

EITEN, L. T. The vegetative anatomy of *Eleocharis interstincta* (Vahl) Roem. and Schult. **Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo**, v. 4, p. 187-228, 1969.

FAY, M. F.; COWAN, R. S.; SIMPSON, D. A. Hybridisation between *Schoenoplectus tabernaemontani* and *S. triqueter* (Cyperaceae) in the British Isles. **Watsonia**, v. 24, n. 3, p. 433-442, 2003.

FELINER, Gonzalo Nieto; ROSSELLÓ, Josep A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 2, p. 911-919, 2007.

FRIESEN, N.; FRITSCH, R.; BACHMAN, N.K. Hybrid origin of some ornamentals of *Allium* subgenus *Melanocrommyum* verified with GISH and RAPD. **Theoretical and Applied Genetics** 95, 1229–1238, 1997.

GARCIA-VALLVÉ, S.; PALAU, J.; ROMEU, A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1125-1134, 1999.

GIL, A. S. B.; BOVE, C. P. *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae) in Rio de Janeiro State, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 163-193, 2007.

GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; PETERSON, P. M. A classification of and key to the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). **Taxon**, p. 433-449, 1997.

GONZÁLEZ ELIZONDO, M. S.; TENA FLORES, J. A. *Eleocharis* (Cyperaceae) in the New World. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (eds). **Monocots: systematics and evolution**. Sidney: CSIRO, 2000. p. 637-643.

GOVAERTS, R. et al. World Checklist of Cyperaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos. 1ª ed. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 2002.

HÅKANSSON, A. Meiosis and pollen mitosis in x-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. **Hereditas**, v. 40, n. 3-4, p. 325-345, 1954.

HARMS, L. J. In Documented chromosome numbers of plants. **Madroño** 17: 266–268, 1964.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, Trude. Organisation of the plant genome in chromosomes. **The Plant Journal**, v. 66, n. 1, p. 18-33, 2011.

HIPP, A. L.; ROTHROCK, P. E.; ROALSON, E. H. The evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). **The Botanical Review**, v. 75, n. 1, p. 96-109, 2009.

HOSHINO, T. Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. **Bulletin of Okayama University Science**, v. 22, p. 305–312, 1987.

KALENDAR, R.; SCHULMAN, A. H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2478, 2006.

KAUR, N.; DATSON, P. M.; MURRAY, B. G. Hybridization amongst New Zealand *Schoenus* (Cyperaceae)?. **New Zealand journal of botany**, v. 49, n. 4, p. 503-507, 2011.

KERBS, B. et al. The potential role of hybridization in diversification and speciation in an insular plant lineage: insights from synthetic interspecific hybrids. **AoB Plants**, v. 9, n. 5, p. plx043, 2017.

KOŠNAR, J. et al. Natural hybridization in tropical spikerushes of *Eleocharis* subgenus *Limnochloa* (Cyperaceae): evidence from morphology and DNA markers. **American journal of botany**, v. 97, n. 7, p. 1229-1240, 2010.

KRAEHMER, H. (Ed.). **Atlas of weed mapping**. John Wiley e Sons, 2016.

LÖVE, A.; et al. Cytotaxonomic of *Carex* section *Cappilares*. **Canadian Journal of Botany** 35: 715-761, 1957.

LUCEÑO, M; VANZELA, ANDRÉ, L.L.; GUERRA, M. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 440-449, 1998.

MARASEK, A. Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium*. **Hereditas** 140, 1–7, 2004.

MARQUES, A. et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals of botany**, 2018.

MELTERS, D. P. et al. Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. **Chromosome Research**, v. 20, n. 5, p. 579-593, 2012.

MICHELAN, V. S. et al. Morphological and genomic characterization of *Rhynchospora tenuis* complex (Cyperaceae) and its taxonomic implications. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 775-784, 2012.

NIJALINGAPPA, B. H. M. Diploid and tetraploid chromosome races in *Fimbristylis ovata* (Cyperaceae). **Cytologia**, v. 40, n. 3-4, p. 557-560, 1975.

PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. **New phytologist**, v. 186, n. 1, p. 5-17, 2009.

PAROKONNY, A. S. et al. Genome reorganization in *Nicotiana* asymmetric somatic hybrids analysed by in situ hybridization. **The Plant Journal**, v. 2, n. 6, p. 863-874, 1992.

PEDERSEN, A. T. M. et al. Hybrid origins of *Carex rostrata* var. *borealis* and *C. stenolepis*, two problematic taxa in *Carex* section *Vesicariae* (Cyperaceae). **PloS one**, v. 11, n. 10, 2016.

POCZAI, P. et al. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 6, 2013.

QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

RAMBAUT, A. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>, 2007.

RATH, S. P.; PATNAIK, S. N. Cytotaxonomic studies in Cyperaceae. **Proc. 59th Indian Sci. Congr.** 3: 361, 1972.

ROALSON, E. H. A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. **Botanical Review**, v. 74, p. 209-393, 2008.

ROALSON, E. H. et al. Phylogenetic relationships in *Eleocharis* (Cyperaceae): C4 photosynthesis origins and patterns of diversification in the spikerushes. **Systematic Botany**, v. 35, n. 2, p. 257-271, 2010.

ROCHA, D. C.; MARTINS, D. Adaptações morfoanatômicas de Cyperaceae ao ambiente aquático. **Planta Daninha**, p. 7-15, 2011.

ROMANO, E. et al. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 40-43, 1998.

SANYAL, B.; SHARMA, A. Cytological studies in Indian Cyperaceae. I. Tribe Scirpeae. **Cytologia** 37: 13-32, 1972.

SAUNTE, Lise H. Chromosome variation in the *Heleocharis palustris-uniglumis* complex. **Nature**, v. 181, n. 4614, p. 1019, 1958.

SHARMA, A. K.; SARKAR, A. K. Chromosome number reports of plants in Annual Report, Cytogenetics Laboratory, Department of Botany, University of Calcutta. **The Research Bulletin** 2: 38-48, 1967-1968.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of hybridization in plant speciation. **Annual review of plant biology**, v. 60, p. 561-588, 2009.

SORENG, R. J. et al. Molecular and morphological evidence for a new grass genus, *Dupontiopsis* (Poaceae tribe Poeae subtribe Poinae sl), endemic to alpine Japan, and implications for the reticulate origin of *Dupontia* and *Arctophila* within Poinae sl. **Journal of systematics and evolution**, v. 53, n. 2, p. 138-162, 2015.

SOUZA, T. B. et al. Analysis of retrotransposon abundance, diversity and distribution in holocentric *Eleocharis* (Cyperaceae) genomes. **Annals of Botany**. 2018.

TENAILLON, Maud I. et al. Genome size and transposable element content as determined by high-throughput sequencing in maize and *Zea luxurians*. **Genome biology and evolution**, v. 3, p. 219-229, 2011.

THIEBAUD, M.A. Contribution a l'étude caryologique *Eleocharis* R.Br. en Suisse. **Candollea** 25:209-219, 1970.

TREVISAN, R. O gênero *Eleocharis* R. Br.(Cyperaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Porto Alegre, 2005.

TREVISAN, R. *Eleocharis* (Cyperaceae) na Região Sul do Brasil. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 225 p, 2009.

TUSPULE, S. H. Cytological studies in *Eleocharis capitata* R.Br. **Proc. 53rd Indian Sci. Congr.** 3:281-282, 1966.

UENO, O.; SAMEJIMA, M.; KOYAMA, T. Distribution and evolution of C4 syndrome in *Eleocharis*, a sedge group inhabiting wet and aquatic environments, based on culm anatomy and carbon isotope ratios. **Annals of Botany**, v. 64, n. 4, p. 425-438, 1989.

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, n. 4, p. 557-566, 2000.

VANZELA, A. L. L.; COLAÇO, W. Mitotic and meiotic behavior of  $\gamma$  irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 611-614, 2002.

YANG, M. et al. AFLP markers in the detection of *Scirpus* × *mariqueter* (CYPERACEAE) hybrid in China. **Aquatic Botany**, v. 91, n. 4, p. 298-302, 2009.

YANO, O.; TANAKA, N.; ITO, Y. Molecular evidence for a natural hybrid between *Isolepis crassiuscula* and *Isolepis lenticularis* (Cyperaceae) in New Zealand. **New Zealand Journal of Botany**, v. 54, n. 4, p. 433-445, 2016.

ZEDEK, F. et al. Correlated evolution of LTR retrotransposons and genome size in the genus *Eleocharis*. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 265-275, 2010.

WANG, N. et al. Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus *Betula* (Betulaceae). **Annals of botany**, v. 117, n. 6, p. 1023-1035, 2016.

WCSP: World Checklist of Selected Plant Families (version Sep 2014). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2015 Annual Checklist (Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Kunze T., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds). Digital resource at [www.catalogueoflife.org/col](http://www.catalogueoflife.org/col). Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858

WIĘCŁAW, H.; WILHELM, M. Natural hybridization within the *Carex flava* complex (Cyperaceae) in Poland: morphometric studies. In: **Annales Botanici Fennici**. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, p. 129-147, 2014.

WHITNEY, Kenneth D. et al. Patterns of hybridization in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 12, n. 3, p. 175-182, 2010.