



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EDIHANNE GAMARRA ARGUELHO

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES BRASILEIRAS  
DE *Rhynchospora* (CYPERACEAE)**

---

Londrina  
2011

EDIHANNE GAMARRA ARGUELHO

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES BRASILEIRAS  
DE *Rhynchospora* (CYPERACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luís Laforga  
Vanzela

Londrina  
2011

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

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

A694e Arguelho, Edihanne Gamarra.

Estudo citogenético em espécies brasileiras de *Rhynchospora* (Cyperaceae) /  
Edihanne Gamarra Arguelho. – Londrina, 2011.  
37 f. : il.

Orientador: André Luis Laforga Vanzela.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

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

CDU 582.542.2

EDIHANNE GAMARRA ARGUELHO

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES BRASILEIRAS DE**  
***Rhynchospora* (CYPERACEAE)**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Maria Suely Pagliarini  
UEM – Maringá – PR

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2011

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho...*

*...A minha família, Rozilane, Edy Willer (in memorian), Crissie, Irwinn, Vana, Jean e ao meu noivo André Luís.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as dádivas recebidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela, pela orientação nesses dois anos de mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e a Universidade Estadual de Londrina, pelo suporte e ensino.

As professoras, Maria Suely Pagliarini e Ana Lúcia Dias, por terem aceitado compor minha banca.

Aos órgãos de fomento, CNPq, pela bolsa concedida, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro dados ao trabalho.

À Sueli, secretaria da pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por sua atenção e paciência.

Aos professores Laurival e Gislaine, por estarem sempre prontos a ajudar e sempre terem uma palavra de incentivo.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal do IAPAR, especialmente a Gislaine e Sandra, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

À professora Vali Joana Pott, por ter nos acompanhado na coleta na Fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte (Campo Grande-MS).

À Dr<sup>a</sup>. Rosangela Maria Simeão Resende e a Embrapa Gado de Corte pela autorização de coleta na Fazenda Modelo.

À minha família, Vana, Crissie, Irwinn e Jean, pelo apoio, compreensão e carinho nesses dois anos longe de casa. Amo muito vocês!!!

Ao meu pai, por ter me ensinado valores que levo sempre comigo. Saudades!!!

À minha mãe, pelo amor, carinho, compreensão e por ter sempre apoiado os meus sonhos e nunca medido esforços para me ajudar a alcançá-los. Mãe, eu te amo!!!

Ao meu noivo, André Luís, pelo amor, compreensão, paciência (principalmente nos últimos meses) e por ter me apoiado nesses dois anos em que ficamos separados.

À Virginia, por seus incansáveis cuidados comigo. Por ter me “aturado”, aconselhado, “alimentado” e pela imensa amizade. Muito obrigada!!!

À família Feronato, por ter me adotado como membro da família e pela força que me deram. Dona Cida obrigada pelas novenas!!!

À família “condomínial”, sempre presente em minha vida, Virginia, Vick, Leonardo e Camila. Obrigada por tudo, sem vocês tudo seria mais difícil!

À minha companheira de apartamento, Vickeline, pela amizade e companheirismo nesses dois anos morando juntas.

À minha companheira de mestrado, Vanessa. Amiga, sem você não teria conseguido. Muito obrigada!!!

À minha amiga Carolina, pela imensurável ajuda, ensinamentos e pela sua imensa amizade. Parceiras sempre!!!

Às minhas amigas Juceli, Josivanda, Gláucia e Priscila. Obrigada meninas!!!

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram com o meu trabalho.

A todos os meus amigos, por estarem sempre comigo.

Muito Obrigada!

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

*“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível e derrepente estará fazendo o impossível.”*

*São Francisco de Assis*

ARGUELHO, Edihanne Gamarra. “**Estudo citogenético em espécies brasileiras de *Rhynchospora* (Cyperaceae)**”. 2011. 37 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

Cyperaceae é a terceira maior família das monocotiledôneas, apresentando cerca de 5.500 espécies e 109 gêneros. Dentre as características encontradas na família estão a presença de cromossomos holocêntricos e de uma ampla variação cromossômica numérica associada, principalmente, a eventos de poliploidia e disploidia. O gênero *Rhynchospora* é o mais representativo no Brasil, com aproximadamente 170 espécies. Estudos citogenéticos, nesse gênero, apontaram variações cromossômicas, interespecíficas, de  $2n = 4$  em *R. tenuis* a  $2n = 62$  em *R. chinensis* e *R. faurieri* além de variações intra-específicas, como as observadas, em *R. tenuis* ( $2n = 4$  e  $8$ ) e *R. holoschoenoides*, *R. confins* e *R. stigera* ( $2n = 10$  e  $20$ ). Neste contexto, este trabalho buscou auxiliar a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e evolução cariotípica do gênero *Rhynchospora*. Para tal, foram feitas análises citogenéticas convencionais, contagens cromossômicas, em 14 espécies coletadas em diferentes estados brasileiros. As espécies foram classificadas em dois subgêneros (*Haplostylae* e *Rhynchospora*) e sete seções (*Dichromena*, *Eu-psilocaryae*, *Spermodontes*, *Marisculae*, *Longirostres*, *Tenues* e *Pluriflorae*). A análise dos cariótipos mostrou a ausência de constrições primárias e a presença de variações numéricas. O menor número cromossômico observado foi  $2n = 4$  em *R. tenuis* e o maior foi  $2n = 58$  em *R. globosa*. Variações intra-específicas foram observadas em *R. globosa* ( $2n = 36, 45$  e  $58$ ), *R. pubera* ( $2n = 10$  e  $12$ ), *R. nervosa* ( $2n = 10, 20$  e  $30$ ) e *R. tenuis* ( $2n = 4$  e  $5$ ). A análise meiótica nas espécies *R. breviuscula*, *R. pubera* ( $2n = 12$ ) e *R. nervosa* ( $2n = 10$ ) mostrou-se regulares. Enquanto, em *R. globosa* foi observada a presença de multivalentes ( $2n = 36$ ) univalentes e trivalentes ( $2n = 45$ ). Os números cromossômicos de *R. aperula*, *R. globosa* ( $2n = 36, 45$  e  $58$ ), *R. pubera* ( $2n = 12$ ), *R. nervosa* ( $2n = 10$ ) e *R. tenuis* ( $2n = 5$ ) são pela primeira vez reportados. As seções *Dichromena*, *Eu-psilocaryae* e *Spermodontes* apresentaram espécies com números cromossômicos múltiplos de cinco ( $x = 5$ ), corroborando com número básico proposto para o gênero *Rhynchospora* e para a família Cyperaceae. As seções *Marisculae*, *Longirostres*, *Tenues* e *Pluriflorae* apresentaram números cromossômicos múltiplos de seis e nove ( $x = 6$  e  $9$ ) que são considerados números básicos secundários para o gênero. Eventos de disploidia foram observados em algumas espécies. Contudo, a poliploidia foi o evento predominante, estando presente em nove das 14 espécies estudadas. Nesse contexto, é possível sugerir que, o gênero *Rhynchospora*, assim como a maioria das angiospermas, tem a poliploidia como o principal mecanismo de evolução dos cariótipos.

**Palavras-Chave:** Cromossomos holocêntricos. Disploidia e Poliploidia.

ARGUELHO, Edihanne Gamarra. “Cytogenetic studies in brazilian species of *Rhynchospora* (Cyperaceae)”. 2011. 37 f. Dissertation (Master’s degree in Genetics and Molecular Biology)-State University of Londrina, Londrina, 2011.

### ABSTRACT

Cyperaceae is the third largest family of monocots, with about 5.500 species and 109 genus. Presence of chromosomes holocentric and a wide variation in chromosome number associated mainly with events of polyploidy and disploidy are among the features found in the family. The genus *Rhynchospora* is the most representative in Brazil with approximately 170 species. Cytogenetic studies in this genus, showed chromosomal variation, interspecific  $2n = 4$  in *R. tenuis* to  $2n = 62$  in *R. chinensis* and *R. faurieri* well as intra-specific variations, such as those observed in *R. tenuis* ( $2n = 4$  and 8) and *R. holoschoenoides*, *R. confins* and *R. stigera* ( $2n = 10$  and 20). So, this study sought to understand the mechanisms involved in the differentiation processes and karyotype evolution of the genus *Rhynchospora*. It was performed conventional cytogenetic, chromosome counts in 14 species collected in different brazilian states for this analysis. The species were classified into two subgenera (*Haplostylae* and *Rhynchospora*) and seven sections (*Dichromena*, *Eu-psilocaryae*, *Spermodontes*, *Marisculae*, *Longirostris*, *Tenues* and *Pluriflorae*). The karyotype analysis showed absence of primary constrictions and presence of numerical variations. The smallest chromosome number was  $2n = 4$  in *R. tenuis* and the highest was  $2n = 58$  in *R. globosa*. Intra-specific variations were observed in *R. globosa* ( $2n = 36, 45$  and 58), *R. pubera* ( $2n = 10$  and 12), *R. nervosa* ( $2n = 10, 20$  and 30) and *R. tenuis* ( $2n = 4$  and 5). The meiotic analysis in species *R. breviscula*, *R. pubera* ( $2n = 12$ ) and *R. nervosa* ( $2n = 10$ ) were regular. While, in *R. globosa* was observed the presence of multivalent ( $2n = 36$ ) univalent and trivalent ( $2n = 45$ ). Chromosome numbers of *R. asperula*, *R. globosa* ( $2n = 36, 45$  and 58), *R. pubera* ( $2n = 12$ ), *R. nervosa* ( $2n = 10$ ) and *R. tenuis* ( $2n = 5$ ) are first reported. The sections *Dichromena*, *Eu-psilocaryae* and *Spermodontes* showed multiple species with chromosome numbers of five ( $x = 5$ ), agreeing with the basic number proposed for the genus *Rhynchospora* and family Cyperaceae. The sections *Marisculae*, *Longirostris*, *Tenues* and *Pluriflorae* showed multiple chromosome numbers of six and nine ( $x = 6$  and 9) which are considered secondary base numbers for the genus. Disploidy events were observed in some species. However, polyploidy was the predominant event, being present in nine of 14 species. Therefore, it is possible to suggest that genus *Rhynchospora*, like most of the angiosperms, have polyploidy as the main mechanism of evolution of the karyotypes.

**Keywords:** Holocentric chromosomes. Polyploidy and Disploidy.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Representantes do gênero *Rhynchospora* ..... 12

### ARTIGO

**Figura 1** – Metáfases e pró-metáfases em oito espécies de *Rhynchospora* ..... 30

**Figura 2** – Metáfases e pró-metáfases mitóticas em 12 espécies de *Rhynchospora* ..... 31

**Figura 3** – Meiose em espécies de *Rhynchospora* ..... 32

**Figura 4** – Idiogramas representando os cariótipos haplóides ..... 33

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE CYPERACEAE E <i>RHYNCHOSPORA</i> .....	11
1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS EM CYPERACEAE E <i>RHYNCHOSPORA</i> .....	12
1.3 MEIOSE EM CYPERACEAE .....	13
<b>2 OBJETIVO</b> .....	16
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>ARTIGO</b> .....	20
RESUMO .....	20
INTRODUÇÃO .....	21
MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
<b>ANEXO</b> .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>CONCLUSÕES</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

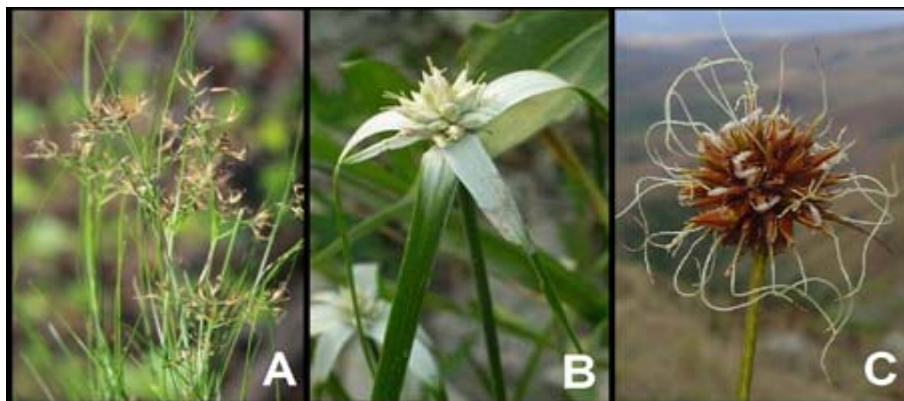
### 1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE CYPERACEAE E *RHYNCHOSPORA*

A família Cyperaceae Juss. é composta por cerca de 5.500 espécies, distribuídas em 109 gêneros e duas subfamílias: Cyperoideae e Caridoideae (BRUHL, 1995; GOVAERTS et al., 2007). No Brasil, ocorrem 678 espécies, distribuídas em 42 gêneros, sendo que os gêneros mais representativos são *Rhynchospora* Vahl. (157 espécies), *Cyperus* L. (101 espécies), *Scleria* Berg. (82 espécies) e *Eleocharis* R. BR. (69 espécies) (ALVES et al., 2009).

Cyperaceae é considerada a terceira maior família das monocotiledôneas. Seus representantes possuem distribuição cosmopolita, sendo comumente encontrados em áreas abertas e alagadas, podendo também ocorrer em bordas de florestas e ambientes drenados (GOETGHEBEUR, 1998). Os membros desta família são caracterizados por plantas de pequeno porte, geralmente rizomatosas, com folhas normalmente alternas espiraladas, rosuladas e paralelinérveas. Suas inflorescências são em forma de espiguetas, geralmente reunidas em glomérulos. Possuem flores pouco vistosas, unissexuadas ou hermafroditas, com fruto seco do tipo aquênio (SOUZA e LORENZI, 2008; DAHLGREN et al., 1985). A polinização e a dispersão ocorrem de modo anemocórico, no entanto, algumas espécies possuem adaptações zoocóricas (DAHLGREN et al., 1985).

O gênero *Rhynchospora* apresenta cerca de 270 espécies (Figura 1), que podem variar de 10 cm a 3 metros de altura e geralmente são perenes. As espécies de *Rhynchospora* destacam-se das outras Cyperaceae por suas espiguetas e características florais. As espiguetas de *Rhynchospora* são arredondadas com seção em cruz, lanceoladas-ovóides ou linear-lanceoladas, com uma ou duas flores, podendo ser uma masculina e outra feminina, ou hermafroditas. As flores geralmente apresentam ovários bicarpelares, raramente unicarpelares, podendo, às vezes, apresentar cerdas na base do ovário que persistem no aquênio maduro. Os aquênios apresentam base do estilopódio alargado e persistente, e o estilete pode ser bífido (dividido) ou indiviso (não dividido). A forma do estilete é considerada uma característica morfológica importante e comumente é utilizada na organização taxonômica do gênero *Rhynchospora* (KÜKENTHAL, 1949;

1950; 1951; DAHLGREN et al., 1985; STRONG, 2006). Baseado nessa característica morfológica, Kükenthal (1949; 1950; 1951) organizou as espécies de *Rhynchospora* em dois subgêneros, *Haplostylae* (espécies com estilete indiviso) e *Diplostylae* (espécies com estilete bifido) que juntos contemplam 27 seções. Thomas (1984) passou a chamar o subgênero *Diplostylae* de subgênero *Rhynchospora*.



**Figura 1** – Representantes do gênero *Rhynchospora*. A) *R. tenuis*, B) *R. ciliata* e C) *R. globosa*.

## 1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE CYPERACEAE E *RHYNCHOSPORA*

Os representantes da família Cyperaceae apresentam características pouco comuns às angiospermas, como: i) microsporogênese com formação de pseudomônades, onde após a meiose ocorre a formação de apenas um grão de pólen funcional (FURNESS e RUDALL, 1999); ii) ocorrência de meiose pós-reducional, onde é possível observar o mesmo número de cromossomos na anáfase I e na metáfase II (DA SILVA et al., 2005); iii) cromossomos holocêntricos, com cinetócoro disperso ao longo do comprimento das suas cromátides (GREILHUBER, 1995).

Cromossomos holocêntricos também foram observados em espécies do gênero *Drosera* (Droseraceae) (SHEIKH e KONDO, 1995; 1996; KONDO e NONTACHAIYAPOOM, 2008), no subgênero *Cuscuta* (Cuscutaceae) (PAZY e PLITMANN, 1994; GUERRA e GARCIA, 2004) e em *Myristica fragrans* (Myristicaceae) (FLACH, 1966). Esse tipo de cromossomos possibilita a manutenção de variações numéricas e estruturais. Essas variações são atribuídas normalmente a eventos de

simploidia (fusão cromossômica), agmatoploidia (fissão cromossômica) e poliploidia (duplicação do complemento cromossômico) (LUCENÑO e GUERRA, 1996; VANZELA et al., 2000; DA SILVA et al., 2008; ROALSON, 2008; HIPPEL et al., 2009). Os números cromossômicos em Cyperaceae variam de  $2n = 4$  em *Rhynchospora tenuis* (VANZELA et al., 1996) à  $2n = \text{ca. } 216$  em *Eleocharis dulcis* (ROALSON, 2008). Algumas espécies exibem variações numéricas intra-específicas, como por exemplo, *Fimbristylis ovata* com  $2n = 10$  e  $20$  (Nijalingappa, 1975), *Eleocharis maculosa* com  $2n = 10, 8, 7$  e  $6$  (DA SILVA et al., 2008), *Carex laevigata* com  $2n = 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78$  e  $80$  (LUCENÑO e CASTROVIEJO, 1991) e *Carex sociata* com  $2n = 40, 41, 42, 43$  e  $44$  (OHKAWA et al., 2000).

No gênero *Rhynchospora*, foram observadas variações cariotípicas numéricas intra-específicas em *Rhynchospora tenuis* com  $2n = 4$  e  $8$ , *R. holoschoenoides*, *R. confinis* e *R. stigera* com  $2n = 10$  e  $20$ , *R. globosa*  $2n = 24, 37$  e  $48$  e *Rhynchospora nervosa* com  $2n = 20$  e  $30$  (VANZELA et al., 1996; 2000; LUCENÑO et al., 1998). O número cromossômico básico principal proposto para *Rhynchospora* é  $x = 5$  (LUCENÑO et al., 1998; VANZELA et al., 2000). Tal número havia sido proposto para a família Cyperaceae por Löve et al. (1957) e posteriormente para os gêneros *Fimbristylis* (NIJALINGAPPA, 1975) e *Eleocharis* (DA SILVA et al., 2005). No entanto, Vanzela et al. (2000) estudaram 12 seções do gênero *Rhynchospora* e dessas, sete apresentaram números cromossômicos múltiplos de cinco e as cinco seções restantes apresentaram números cromossômicos múltiplos de seis e nove ( $x = 6$  e  $x = 9$ ). Segundo Luceño et al. (1998), estes últimos números básicos podem ser considerados secundários para o gênero *Rhynchospora*.

### 1.3 MEIOSE EM CYPERACEAE

O comportamento meiótico na família Cyperaceae é diferente do encontrado na maioria das angiospermas. Esta família possui algumas peculiaridades em sua meiose, atribuídas, principalmente, a presença de cromossomos holocêntricos (GREILHUBER, 1995).

A primeira característica observada na meiose acontece na metáfase I, onde, o pareamento dos cromossomos homólogos gera uma configuração em forma de “caixa”, como mencionado por Vanzela et al. (2000) para *Rhynchospora cephalotes*. A

segunda característica é a ocorrência de meiose invertida ou pós-reducional onde, na anáfase I, ocorre a migração das cromátides irmãs em direção aos pólos opostos da célula e não dos cromossomos homólogos, como comumente é observado em organismos com cromossomos monocêntricos. Desta forma, não há redução do número cromossômico ao fim da primeira fase da meiose.

A meiose invertida foi demonstrada em *Eleocharis subarticulata* ( $2n = 6$ ) por Da Silva et al. (2005). Estes autores observaram, na anáfase I e metáfase II, a presença de dois grupos de seis cromátides, sugerindo que houve a separação das cromátides irmãs e não de cromossomos homólogos. Greilhuber (1995) sugeriu que a meiose invertida é uma característica comum às famílias Cyperaceae e Juncaceae. Esta também foi observada em representantes do gênero *Luzula* - Juncaceae (BRASELTON, 1981) e no subgênero *Cuscuta* - Cuscutaceae (PAZY e PLITMAN, 1994).

A terceira característica da meiose em Cyperaceae é a microsporogênese com ausência de tétrades e a formação de pseudomônades, onde, ao final da meiose, três dos quatro núcleos formados são degenerados e somente um torna-se funcional. O núcleo funcional se divide, formando um núcleo vegetativo e um generativo. O núcleo generativo entra em uma nova divisão dando origem a duas células gaméticas (FURNESS e RUDALL, 1999). Da Silva et al. (2005), observaram em *Eleocharis subarticulata* a migração de três dos quatro grupos de cromátides para um dos pólos na transição da metáfase II para a anáfase II, sugerindo o início da degeneração de três dos quatro núcleos e consequente falha na formação da tétrade.

Estudos meióticos foram fundamentais para compreender os mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação cariotípica na família Cyperaceae. Inúmeros trabalhos mostraram, que as diferentes associações encontradas durante a meiose podem revelar o tipo de evento envolvido na evolução das espécies. Em *Carex flacca*, Davies (1956) observou a presença de univalentes, bivalentes e multivalentes e essas observações levaram a autora a sugerir, que a origem da espécie se deu por eventos de hibridização ou autoploidia. Em *Carex laevigata* ( $2n = 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78$  e  $80$ ), a presença de trivalentes heteromórficos sugeriu que eventos de agmatoploidia sejam os responsáveis pela série numérica observada nas populações (LUCENÑO e CASTROVIEJO, 1991). Em *Eleocharis maculosa* ( $2n = 6, 7, 8$  e  $10$ ) foi observada a presença de trivalentes no cariótipo com  $2n = 8$ , tetravalentes e trivalentes em  $2n = 7$ , hexavalentes em  $2n = 6$  e apenas bivalentes em  $2n = 10$ . Essas configurações sugerem que a simploidia foi o principal

mecanismo envolvido na redução cromossômica da espécie (DA SILVA et al., 2008). Em *Eleocharis subarticulata* ( $2n = 6$ ) a formação de um “anel” de seis cromossomos, na metáfase I, indicou que a redução do número cromossômico em relação ao número básico  $x = 5$  se deu por múltiplas translocações (DA SILVA et al., 2005).

Análises citogenéticas convencionais de mitose e meiose fornecem informações aparentemente simples, ou, segundo Guerra (2008), fornecem parâmetros simples para comparações cariotípicas. Contudo, a família Cyperaceae tem apenas uma pequena porção de suas espécies estudadas (16%), sendo a maioria do gênero *Carex* (ROALSON, 2008). Contagens cromossômicas em outros gêneros de Cyperaceae são necessárias para auxiliar na compreensão da evolução cariotípica dessa família, sobretudo, quando considerada a variação cromossômica numérica existente entre espécies e/ou populações de uma mesma espécie. Desta forma, neste trabalho, buscamos entender quais os mecanismos de variação numérica que são encontrados em *Rhynchospora*.

## 2 OBJETIVO

Realizar análises citogenéticas convencionais, em 14 espécies do gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) e comparar os resultados com os dados disponíveis na literatura para entender quais os mecanismos de organização e diferenciação cariotípica que estão atuando no gênero *Rhynchospora*.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M.; ARAUJO, A. C.; PRATA, A. P.; VITTA, F.; HEFLER, S.; TREVISAN, R.; GIL, A. S. B.; MARTINS, S.; THOMAS, W. Diversity of Cyperaceae in Brazil. **Rodriguésia**. v. 60, n. 4, p. 771-782, 2009.
- BRASELTON, J. P. The ultrastructure of meiotic kinetochores of *Luzula*. **Chromosoma**. v.82, p. 143-151, 1981.
- BRUHL, J. J. Sedge Genera of the World: Relationships and new classification of the Cyperaceae. **Australian Systematic Botany**. v. 8, p. 125-305, 1995.
- DA SILVA, C. R. M.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L. L. Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 149, p. 457-464, 2005.
- DA SILVA, C. R. M.; GONZÁLEZ-ELIZONDO, M. S.; VANZELA, A. L. L. Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). **Cytogenetic and Genome Research**. v. 122, p. 175-180, 2008.
- DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The Families of the Monocotyledons: Structure, Evolution, and Taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1985.
- DAVIES, E. W. Cytology, evolution and origin of the aneuploid series in the genus *Carex*. **Hereditas**. v. 42, p. 349-365, 1956.
- FLACH, M. Diffuse centromeres in Dicotyledoneous plant. **Nature**. v. 209, p. 1369-1370, 1966.
- FURNESS, C. A.; RUDALL, P. J. Microsporogenesis in Monocotyledons. **Annals of Botany**. v. 84, p. 475-499, 1999.
- GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. In: KUBITZKI, K. **The Families and Genera of Vascular Plant IV. Flowering Plants-Monocotyledons**. Berlin: Springer-Verlag, 1998.
- GOVAERTS, R.; SIMPSON, D. A.; BRUHL, J. J.; EGOROVA, T.; GOETGHEBEUR, P.; WILSON, K. **World 13 checklist of Cyperaceae, Sedges**. Surrey: Kew Gardens, 2007.
- GREILHUBER, J. Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In: RUDALL, P. J.; CRIBB, P. J.; CULER, D. F.; HUMPHRIES, C. J. (ed.). **Monocotyledons: Systematics and Evolution**. Surrey: Royal Botanic Gardens, 1995.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 120, p. 339-350, 2008.

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

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.

KONDO, K.; NONTACHAIYAPOOM, S. An evidence of diffused centromeres in *Drosera* chromosomes provided by scanning electron microscopy. **Chromosome Botany**. v. 3, p. 79-81, 2008.

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

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

KÜKENTHAL, G. Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora*. **Botanische Jahrbücher Systematic**. v. 75, p. 273-314, 1951.

LÖVE, A.; LÖVE, D.; RAYMOND, M. Cytotaxonomy of *Carex* section capillares. **Canadian Journal of Botany**. v. 35, p. 715-761, 1957.

LUCENÑO, M.; CASTROVIEJO, S. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. **Plant Systematics and Evolution**. v. 177, p. 149-159, 1991.

LUCENÑO, M.; GUERRA, M. Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. **Caryologia**. v. 49, p. 301-309, 1996.

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

NIJALINGAPPA, B. H. M. Diploid and tetraploid chromosome races in *Fimbristylis ovata* (Cyperaceae). **Cytologia**. v. 40, p. 55-560, 1975.

OHKAWA, T.; YOKOTA, M.; HOSHINO, T. Aneuploidal population differentiation in *Carex sociata* Boott (Cyperaceae) of the Ryukyu Islands, Japan. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 132, p. 337-358, 2000.

PAZI, B.; PLITMANN, U. Holocentric chromosome behaviour in *Cuscuta* (Cuscutaceae). **Plant Systematic and Evolution**. v. 191, p. 105-109, 1994.

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

SHEIKH, A. S.; KONDO, K. Differential staining with Orcein, Giemsa, CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). **American Journal of Botany**. v. 82, p. 1278-1186, 1995.

SHEIKH, A. S.; KONDO, K. Comparative C-banding and fluorescent-banding analysis of seven species of *Drosera* (Droseraceae). **Cytologia**. v. 61, p. 383-394, 1996.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado no APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STRONG, M. T. **Taxonomy and Distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America**. Washington: Department of Botany National Museum of Natural History, 2006.

THOMAS, W. W. The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. **Memoirs of the New York Botanical Garden**. v. 37, p. 1-116, 1984.

VANZELA, A.L.L.; GUERRA, M.; LUCEÑO, M. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae): a species with the lowest number of holocentric chromosomes. **Cytobios**. v. 88, p. 219-228, 1996.

VANZELA, A.L.L.; LUCEÑO, M.; GUERRA, M. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 134, p. 557-566, 2000.

## ARTIGO

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM ESPÉCIES BRASILEIRAS DE  
*Rhynchospora* (CYPERACEAE)**

Artigo a ser submetido à revista *Australian Journal of Botany*

**Estudo citogenético em espécies brasileiras de *Rhynchospora* (Cyperaceae)**

Edihanne Gamarra Arguelho<sup>1</sup>, Vanessa Silva Michelan<sup>1</sup>, Carlos Roberto Maximiano Da Silva<sup>2</sup> e André Luís Laforga Vanzela<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina-UEL, Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Londrina-PR, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Agrônomo do Paraná- IAPAR, Londrina-PR, Brasil

\*Autor para correspondência E-mail: [andrevanzela@uel.br](mailto:andrevanzela@uel.br)

**Resumo**

O gênero *Rhynchospora* (Cyperaceae) apresenta cerca de 270 espécies, organizadas em dois subgêneros e 27 seções. Estudos citogenéticos nesse gênero, mostraram a presença de cromossomos holocêntricos e de variações cromossômicas intra-específicas, como as observadas, em *R. tenuis* ( $2n = 4$  e  $8$ ) e *R. holoschoenoides*, *R. confinis* e *R. stigera* ( $2n = 10$  e  $20$ ). Neste contexto, este trabalho buscou auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e evolução cariotípica do gênero *Rhynchospora*. Para tal, foram feitas análises citogenéticas convencionais, contagens cromossômicas, em 14 espécies coletadas em diferentes estados brasileiros. As análises mostraram ausência de constrição primária e variação numérica de  $2n = 4$  em *R. tenuis* a  $2n = 58$  em *R. globosa*. *Rhynchospora asperula* apresentou  $2n = 18$  e teve seu número cromossômico relatado pela primeira vez, bem como os cariótipos  $2n = 10$  de *R. nervosa*,  $2n = 12$  de *R. pubera* e  $2n = 36, 45$  e  $58$  de *R. globosa*. O número básico  $x = 5$ , proposto como principal para o gênero, foi descrito nas seções *Dichromena*, *Eu-psilocaryae* e *Spermodontes*. Os números básicos secundários  $x = 6$  e  $9$  estiveram presentes nas seções *Marisculae*, *Longirostres*, *Tenues* e *Pluriflorae*. Eventos de agmatoploidia foram observados em algumas espécies, contudo, a poliploidia foi o evento predominante, estando presente na maioria das espécies. Nossos dados, em conjunto com a literatura, sugerem que a poliploidia é o principal evento responsável pela evolução cariotípica em *Rhynchospora*.

**Palavras-Chave:** Cromossomos holocêntricos. Displóidia e Poliploidia.

## INTRODUÇÃO

Cyperaceae Juss. é considerada a terceira maior família de monocotiledôneas, com cerca de 5.500 espécies divididas em 109 gêneros, dois subgêneros e 27 seções (Kükenthal 1949; 1950; 1951; Thomas 1984; Bruhl 1995; Goetghebeur 1998; Govaerts *et al.* 2007). Seus representantes são comumente encontrados em áreas abertas e alagadas, podendo também ocorrer em bordas de florestas e ambientes drenados (Goetghebeur 1998).

A família Cyperaceae é conhecida por apresentar microsporogênese com formação de pseudômonades, ocorrência de meiose pós-reducional e cromossomos holocêntricos (Greilhuber 1995; Furness e Rudall 1999; Da Silva *et al.* 2005). As variações numéricas e estruturais encontradas em cariótipos com cromossomos holocêntricos estão, normalmente, associadas a eventos de disploidia (simploidia e agmatoploidia) e poliplodia (Luceño e Guerra 1996). Os números cromossômicos descritos para Cyperaceae variam de  $2n = 4$  em *Rhynchospora tenuis* a  $2n =$  ca. 216 em *Eleocharis dulcis* (Vanzela *et al.* 1996; Roalson 2008).

O gênero *Rhynchospora* é o mais representativo no Brasil, apresentando 157 espécies, das 270 registradas no mundo (Strong 2006; Alves *et al.* 2009). Estudos citogenéticos realizados em espécies deste gênero reportaram variações cromossômicas de  $2n = 4$  em *R. tenuis* a  $2n = 62$  em *R. chinensis* e *R. faurieri* (Vanzela *et al.* 1996; Hoshino 1987), além de variações intraespecíficas como em *Rhynchospora tenuis*  $2n = 4$  e 8, *R. holoschoenoides*, *R. confins* e *R. stigera* com  $2n = 10$  e 20, *R. globosa* com  $2n = 24$ , 37 e 48 e *Rhynchospora nervosa* com  $2n = 20$  e 30 (Vanzela *et al.* 1996; 2000; Luceño *et al.* 1998). O número básico principal proposto para o gênero é  $x = 5$  (Luceño *et al.* 1998; Vanzela *et al.* 2000), número que também foi citado para os gêneros *Eleocharis* (Da Silva *et al.*, 2005), *Fimbristylis* (Nijalingappa 1975) e outros representantes da família Cyperaceae (Löve *et al.*, 1957). No entanto, os números básicos  $x = 6$  e 9, como sendo números básicos secundários em *Rhynchospora* (Luceño *et al.* 1998; Vanzela *et al.* 2000).

Contagens cromossômicas e análises do comportamento meiótico oferecem importantes informações evolutivas e permitem inferir relações genéticas entre espécies próximas. Em espécies com cromossomos holocêntricos essas análises se tornam ainda mais relevantes, haja vista que quando este tipo cromossômico sofre rearranjo por simploidia e agmatoploidia os cromossomos reorganizados permanecem viáveis nas

divisões celulares subsequentes (Vanzela e Colaço 2002). Neste contexto, este trabalho buscou auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de diferenciação e evolução cariotípica do gênero *Rhynchospora*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados três indivíduos, de 14 espécies do gênero *Rhynchospora*, nos estados do Amazonas, Mato Grosso do Sul, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina e São Paulo (Tabela 1). Esses exemplares foram cultivados em vasos no viveiro de mudas do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina-PR. Amostras desses exemplares foram herborizadas e enviadas para identificação (por especialista) e registro no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR), em Florianópolis-SC.

Foram coletadas pontas de raízes jovens, essas foram pré-tratadas com 8HQ (8-hidroxiquinoleína, 2mM), sendo mantidas por uma hora em temperatura ambiente e 23 horas a 16 °C. Esse material foi então fixado em uma solução de etanol:ácido acético (3:1, v:v) por 12 horas, à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, mantidas a -20 °C até o uso. Para preparação das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador e lavadas em água destilada por 10 minutos e, em seguida digeridas em uma solução de celulase 4%:pectinase 40%, (v:v) por três horas a 37 °C. Após a digestão, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1M a 60 °C por 10 minutos e novamente lavadas em água destilada por 10 minutos. A separação dos meristemas foi feita sobre uma lâmina, com auxílio de agulhas, em uma gota de ácido acético 60%, coberto por lamínula e esmagado. Após o esmagamento, o conjunto lâmina/lamínula foi congelado em nitrogênio líquido por alguns segundos e a lamínula removida. As lâminas foram coradas em solução de Giemsa 2% e montadas com Entellan. Foram avaliadas, pelo menos, 10 metáfases de cada amostra, e a captura de imagens foi feita em um fotomicroscópio Leica DM 4500 B, com o programa IM50 (Leica).

As análises das metáfases foram feitas em imagens com condensação semelhante. A medição foi feita com auxílio do programa MicroMeasure\_3.3, disponível no site: <http://www.colostate.edu/Depts/Biology/Micrommeasure/>. O tamanho dos cromossomos e do complemento diplóide foi feito com base na média obtida e os

idiogramas foram montados baseados na média do comprimento absoluto dos cromossomos.

Para o estudo meiótico, espiguetas jovens foram dissecadas para retirada das anteras. Essas foram fixadas em etano:ácido acético (3:1, v:v) por 12 horas, à temperatura ambiente, sendo, posteriormente, mantidas a -20 °C até o uso. Para preparação das lâminas, as anteras foram hidrolisadas em HCl 1M a 60 °C por 10 minutos e lavadas três vezes por cinco minutos em água destilada. As anteras foram então colocadas em uma gota de ácido acético 60%, dissecadas com auxílio de agulhas e cobertas com lamínula. Após o esmagamento, o conjunto lâmina/lamínula foi congelado em nitrogênio líquido para a retirada da lamínula. Os materiais foram corados com Giemsa e fotografadas em um fotomicroscópio Leica DM 4500 B, com o programa IM50 da Leica.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 14 espécies de *Rhynchospora*. Essas foram agrupadas segundo a classificação proposta por Kükenthal (1949, 1950, 1951) em dois subgêneros (*Haplostylae* e *Rhynchospora*) e sete seções (*Longirostres*, *Pluriflorae*, *Marisculae*, *Eupsilocarye*, *Dichromena*, *Tenues* e *Spermodontes*) (Tabela 1). As análises mostraram ausência de constrição primária, o que é característico de cromossomos holocêntricos. A presença de cromossomos holocêntricos é considerada uma sinapomorfia na família Cyperaceae (Greilhuber 1995), já tendo sido descrita em gêneros como *Rhynchospora* (Vanzela *et al.* 1996; 2000; Luceño *et al.* 1998), *Carex* (Davies 1956), *Fimbristylis* (Nijalingapa 1975), *Scleria* (Yano e Hoshino 2007) e *Eleocharis* (Da Silva *et al.* 2008b; 2010).

### ***Subgênero Haplostylae***

#### ***Seção Longirostres***

Três espécies da seção *Longirostres* foram estudadas, *R. asperula*, *R. corymbosa* e *R. gigantea*. Em todas foram observados cariótipos com  $2n = 18$  (Figuras 1A-C, respectivamente) e cromossomos decrescendo em tamanho (Figuras 4A-C,

respectivamente). *Rhynchospora gigantea* apresentou maior complemento diplóide, com cromossomos variando de 3,21  $\mu\text{m}$  à 1,46  $\mu\text{m}$  (Tabela 1), enquanto *R. asperula*, que tem seu número cromossômico descrito pela primeira vez, foi a que apresentou menor complemento diplóide, com cromossomos variando de 2,11  $\mu\text{m}$  a 0,93  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Segundo Luceño *et al.* (1998), a seção *Longirostres* é composta por 13 espécies, sendo 9 encontradas no Brasil. Esses autores estudaram cinco espécies, das quais, duas tiveram seus números cromossômicos confirmados neste trabalho: *R. corymbosa* e *R. gigantea*. O número  $2n = 18$  encontrado em todas as espécies dessa seção reforça a ocorrência de um número básico secundário ( $x = 6$  e  $9$ ), associado à poliploidização.

### **Seção Pluriflorae**

*Rhynchospora globosa* apresentou três números cromossômicos diferentes (Tabela 1),  $2n = 36$  - Terenos-MS (Figura 1D),  $2n = 45$  - Tibagi-PR (Figura 1E) e  $2n = 58$  - Castro-PR (Figura 1F), sendo todos descritos pela primeira vez. Os três cariótipos apresentam morfologia similar e cromossomos decrescendo levemente em tamanho (Figuras 4D-F). A análise meiótica realizada na população com  $2n = 36$  mostrou meiose irregular com ocorrência de multivalentes (Figura 3F). A presença de meiose irregular também foi observada na população com  $2n = 45$ , na qual, foram observados cromossomos trivalentes e univalentes (Figuras 3G e H). Luceño *et al.* (1998) estudaram três populações de *R. globosa* e encontraram cariótipos com  $2n = 24$ ,  $37$  e  $48$ . Esses seis números cromossômicos distintos, juntamente com o perfil irregular da meiose, sugerem que o processo de diferenciação populacional encontrado em *R. globosa* pode estar associado a eventos de poliploidização e disploidia, o que tornaria seus cariótipos aparentemente instáveis.

### **Subgênero Rhynchospora**

#### **Seções Marisculae e Eu-psilocaryae**

Na seção *Marisculae*, apenas *R. marisculus* foi estudada. Esta espécie apresentou cariótipo com  $2n = 36$  (Figura 1G) e cromossomos decrescendo em tamanho (Figura 4G), sendo o maior com 2,0  $\mu\text{m}$  e o menor com 1,2  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Vanzela *et al.*

(2000) analisaram os cariótipos de *R. marisculus*, *R. rugosa*, *R. barrosiana* e *R. brownii*, descrevendo também  $2n = 36$  para todas as espécies. Os números cromossômicos descritos para seção *Marisculae* corroboram com a existência de um número básico secundário para o gênero *Rhynchospora* associado a eventos de poliploidia.

*Rhynchospora velutina*, a única espécie da seção *Eu-psilocaryae* estudada neste trabalho, apresentou cariótipo com  $2n = 10$  (Figura 1H) e cromossomos decrescendo em tamanho (Figura 4G), sendo o maior com 3,21  $\mu\text{m}$  e o menor com 2,18  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). Vanzela *et al.* (2000) estudaram três espécies desta seção (*R. robusta*, *R. eximia* e *R. velutina*) e encontraram sempre  $2n = 10$ , que é correspondente ao número básico primário ( $x = 5$ ) proposto para o gênero *Rhynchospora* e para família Cyperaceae.

### Seção *Dichromena*

Quatro espécies da seção *Dichromena* foram estudadas, *R. brevisuscula*, *R. ciliata*, *R. nervosa* e *R. pubera*. *Rhynchospora brevisuscula* e *R. ciliata* apresentaram cariótipos com  $2n = 10$  (Figuras 2A e B) e cromossomos decrescendo em tamanho (Figuras 4I e J). Em *R. brevisuscula* também foi feito estudo meiótico, sendo observada a presença de cinco bivalentes (Figura 3A). *Rhynchospora nervosa* apresentou números cromossômicos diferentes entre as populações estudadas (Tabela 1). A população de Florianópolis-SC exibiu  $2n = 10$  (Figura 2C) e meiose regular (Figuras 3B-C), sendo este número pela primeira vez relatado para a espécie. A população de São Paulo-SP apresentou  $2n = 20$  (Figura 2D) e a de Cabo de Santo Agostinho-PE  $2n = 30$  (Figura 2E). Esses dois últimos números corroboram com os números observados por Luceño *et al.* (1998) para outras localidades. Os tamanhos totais do complemento diplóide em *R. nervosa* acompanharam os níveis de ploidia, sendo 20,94  $\mu\text{m}$  para  $2n = 2x = 10$ ; 41,25  $\mu\text{m}$  para  $2n = 4x = 20$ ; e 62,27  $\mu\text{m}$  para  $2n = 6x = 30$ . Além disso, não foram observadas grandes variações nas medidas dos maiores e menores cromossomos de cada complemento (Tabela 1). Estes dados sugerem que a poliploidia é o evento responsável por esta diferenciação cariotípica interpopulacional.

*Rhynchospora pubera* apresentou dois números cromossômicos diferentes,  $2n = 10$  na população do Açude Dois Irmãos-PE (Figura 2F) e  $2n = 12$  na população de Manaus-AM (Figura 2G), sendo o último descrito pela primeira vez. A meiose de *R. pubera* com  $2n = 10$  havia sido relatada por Luceño *et al.* (1998). Neste

trabalho, os autores encontraram células com  $5^{II}$  e outras com  $4^{II}+2^I$ . Este mesmo comportamento meiótico foi encontrado na população com  $2n = 12$ , onde foram observadas células com  $6^{II}$  e com  $5^{II}+2^I$  (Figuras 3D e E, respectivamente). Provavelmente, o cariótipo com  $2n = 12$  tenha sido originado por um evento de agmatoploidia a partir do cariótipo com  $2n = 10$ , já que o número básico provável para a seção é  $x = 5$  (Luceño *et al.* 1998).

### Seções *Tenues* e *Spermodontes*

Foram analisadas três espécies da seção *Tenues*. *Rhynchospora junciformis* e *R. austro-brasiliensis* apresentaram cariótipos com  $2n = 18$  (Figuras 2J e K, respectivamente) e cromossomos decrescendo em tamanho (Figuras 4R e S). *Rhynchospora tenuis* apresentou cariótipos com  $2n = 4$  e  $2n = 5$ , sendo o último observado em apenas um indivíduo da população de Castro-PR (Figuras 2H e I, respectivamente). O cariótipo com  $2n = 4$  apresenta dois cromossomos maiores e dois menores (Figura 4P), como anteriormente descrito por Vanzela *et al.* (1996; 2003) e o cariótipo com  $2n = 5$  apresenta um cromossomo maior e quatro menores (Figura 4Q). Como  $2n = 4$  foi encontrado em diversas populações brasileiras e o cariótipo variante ( $2n = 5$ ) em apenas um indivíduo de uma população, sugerindo que este número teve origem recente por agmatoploidia.

Na seção *Spermodontes*, apenas a espécie *R. tenerrima* foi estudada. Esta espécie, coletada no Sudeste do Brasil (Tabela 1), apresentou um cariótipo com  $2n = 20$  (Figuras 2L e 4T). Este número já havia sido reportado por Vanzela *et al.* (2000) para populações no Norte e Nordeste Brasileiro, sugerindo que, essa espécie, está mantendo o nível tetraplóide correspondente ao número básico  $x = 5$ .

### Diferenciação cariotípica em *Rhynchospora*

Segundo Luceño e Guerra (1996), em organismos com cromossomos holocêntricos, a variação numérica é explicada pela poliploidia, a qual estabelece um grande aumento nos números cromossômicos, e pelas disploidias (agmatoploidia e simploidia) que promovem pequenos aumentos ou decréscimos nos números

cromossômicos. Dessa forma é possível sugerir que  $2n = 12$  em *R. pubera* e  $2n = 5$  em *R. tenuis* tenham sido derivados por agmatoploidia. Num sentido contrário, Da Silva *et al.* (2008a) reportou o processo de fusão cromossômica ou simploidia para explicar a ocorrência dos números  $2n = 10, 8, 7$  e  $6$  em *Eleocharis maculosa*. É possível que em *R. globosa*, para a qual já foram descritos seis números cromossômicos, a associação, de poliploidia e disploidia, sejam as responsáveis pela ocorrência destas séries numéricas. Esta série numérica associada à ocorrência de meiose irregular torna difícil sugerir o número cromossômico original para *Rhynchospora globosa*, bem como a sequência dos eventos no processo de diferenciação dos cariótipos. Eventos de disploidia associados à poliploidia também foram reportados para *Carex sociata* com  $2n = 40, 41, 42, 43$  e  $44$  (Ohkawa *et al.* 2000), *Carex hirta*  $2n = 111, 112, 113$  e  $114$  (Luceño 1993) e *Carex laevigata* com  $2n = 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 78$  e  $80$  (Luceño e Castroviejo 1991).

Neste estudo a poliploidia foi o evento dominante, estando presente em nove (*R. asperula*, *R. corymbosa*, *R. gigantea*, *R. globosa*, *R. junciformis*, *R. autrobrasiliensis*, *R. nervosa*, *R. marisculus* e *R. tenerrima*) das 14 espécies estudadas. Eventos de poliploidia em *Rhynchospora* já foram relatados por Vanzela *et al.* (1996; 2000) e Luceño *et al.* (1998). No estudo feito por Vanzela *et al.* (2000), a poliploidia esteve presente em 59% das espécies estudadas. Um comportamento similar também foi encontrado em *Eleocharis*, onde Da Silva *et al.* (2010) observaram poliploidia em 80% das espécies. A poliploidia é um evento comum nas angiospermas e, segundo Cui *et al.* (2006), a maioria das angiospermas têm, pelo menos, um ancestral poliplóide.

Nossos dados, em conjunto com a literatura, sugerem que o gênero *Rhynchospora*, assim como a maioria das angiospermas, tem a poliploidia como o principal mecanismo de evolução dos cariótipos. Contudo, a família Cyperaceae tem apenas 16% das espécies citogeneticamente estudadas, a maioria do gênero *Carex* (Roalson 2008), sendo necessários novos estudos, que contemplem contagens cromossômicas e análises meióticas, para entender a base das variações cromossômicas em Cyperaceae e o papel dos eventos de poliploidia e disploidia no processo de evolução cariotípica desta família.

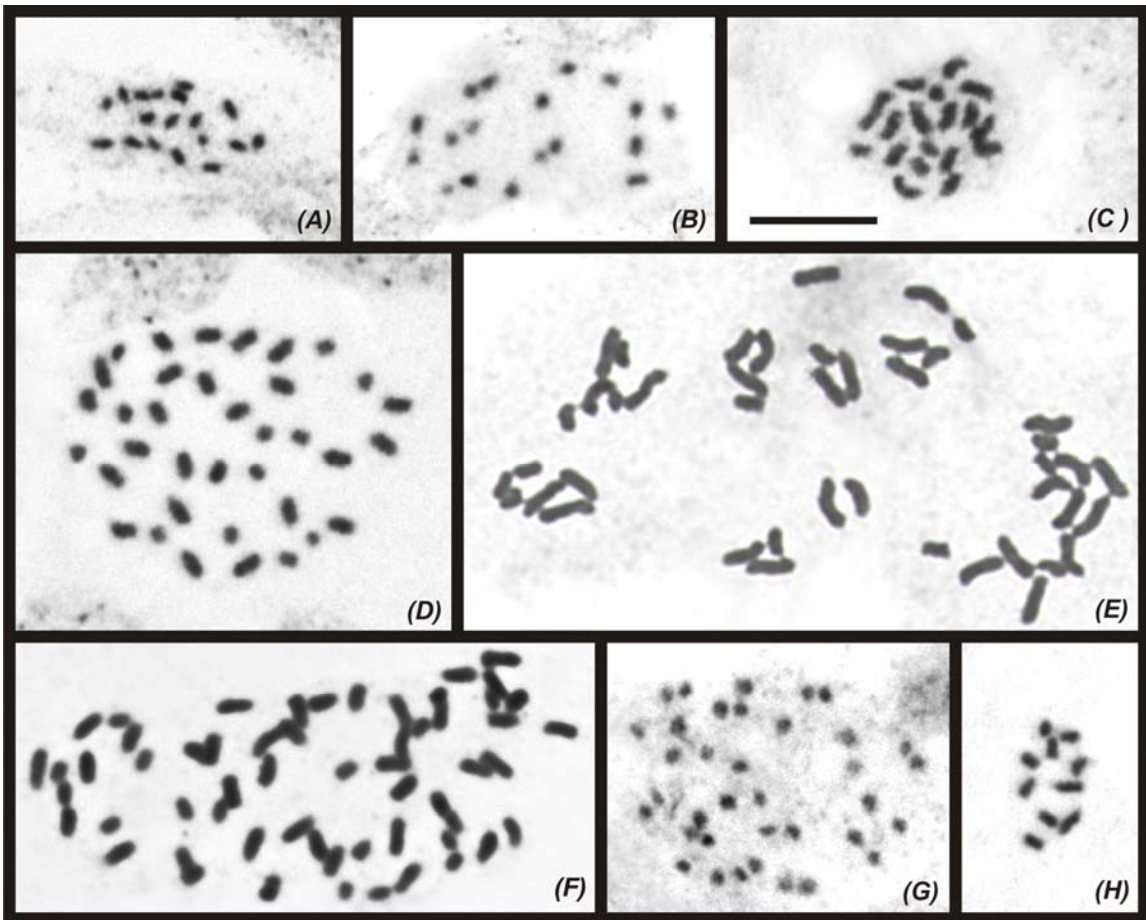
**ANEXO**

**Tabela 1 – Características dos cariótipos de 14 espécies do gênero *Rhynchospora*.** As espécies foram organizadas segundo a classificação de Kükenthal (1949, 1950, 1951) e são apresentados os números cromossômicos observados, os tamanhos dos complementos diplóides, os tamanhos dos maiores e menores cromossomos, os números das figuras correspondentes e os locais de coleta.

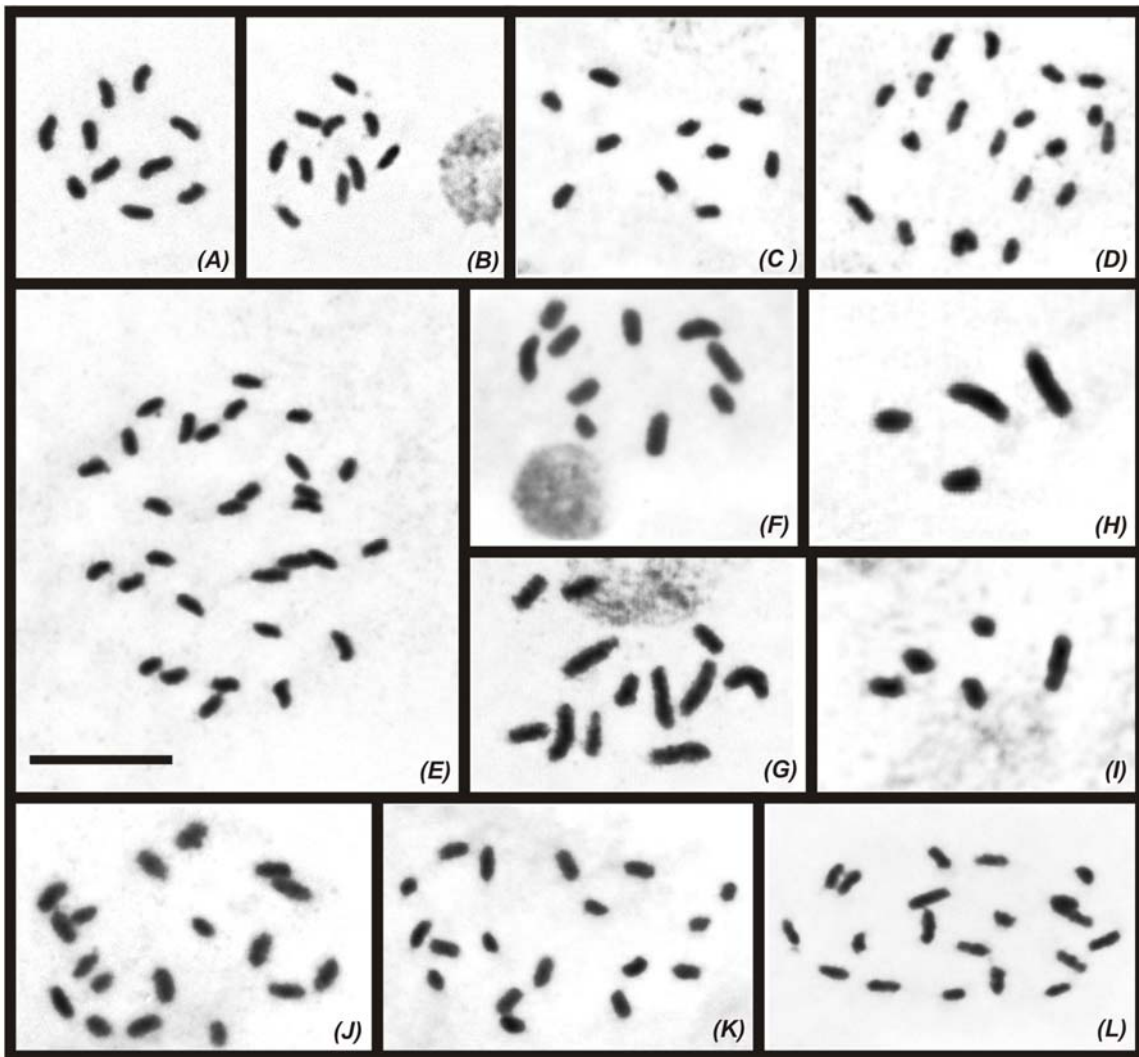
Espécie	Seção	2n	CTD*( $\mu\text{m}$ )	CM-Cm**( $\mu\text{m}$ )	Fig	Localização e Coordenadas
<b>Subgênero <i>Haplostylae</i></b>						
<i>R. asperula</i>	<i>Longirostres</i>	18	26,91	2,11-0,93	1A	Jataizinho-PR, S25°17'48'' W49°54'42''
<i>R. corymbosa</i>	<i>Longirostres</i>	18	34,06	2,15-1,24	1B	Terenos-MS, S20°33'25''W54°47'45''
<i>R. gigantea</i>	<i>Longirostres</i>	18	43,80	3,21-1,46	1C	Irati-PR, S25°28'02''W50°39'04''
<i>R. globosa</i>	<i>Pluriflorae</i>	36	82,21	3,07-1,34	1D	Terenos-MS, S20°33'25''W54°47'45''
		45	146,65	4,68-1,62	1E	Tibagi-PR, S24°30'04''W50°25'51''
		58	140,85	3,42-1,56	1F	Castro-PR, S50°15'21''W24°34'5''
<b>Subgênero <i>Rhynchospora</i></b>						
<i>R. marisculus</i>	<i>Marisculae</i>	36	57,60	2,00-1,20	1G	Anhanduí-MS, S21°12'25''W54°30'03''
<i>R. velutina</i>	<i>Eu-Psilocaryae</i>	10	25,25	3,21-2,18	1H	Terenos-MS, S20°33'25''W54°47'45''
<i>R. breviscula</i>	<i>Dichromena</i>	10	21,54	2,73-1,71	2A	Recife-PE, S8°11'24''W34°56'47''
<i>R. ciliate</i>	<i>Dichromena</i>	10	15,62	1,83-1,38	2B	Recife-PE, S8°11'24''W34°56'47''
<i>R. nervosa</i>	<i>Dichromena</i>	10	20,94	2,77-1,62	2C	Florianópolis-SC, S27°35'33''W48°28'50''
		20	41,25	2,55-1,56	2D	São Paulo-SP, S23°34'24''W46°27'55''
		30	62,27	2,76-1,76	2E	Cabo de Santo Agostinho-PE, S8°16'27''W35°01'46''
		10	25,46	3,31-1,94	2F	Açude Dois Irmãos-PE, S8°00'38' W34°56'47''
<i>R. pubera</i>	<i>Dichromena</i>	12	46,02	4,72-2,55	2G	Manaus-AM, S03°08'05''W60°01'63''
		4	15,21	4,91-2,65	2H	Terenos-MS, S20°33'25''W54°47'45''
		5	15,09	4,82-1,66	2I	Castro-PR, S50°15'21''W24°34'5''
<i>R. junciformis</i>	<i>Tenues</i>	18	42,20	3,0-1,72	2J	Anhanduí-MS, S21°12'25''W54°30'3''
<i>R. austro-brasiliensis</i>	<i>Tenues</i>	18	57,07	4,38-2,06	2K	Ivinhema-MS, S22°21'47''W53°30'54''
<i>R. tenerrima</i>	<i>Spermodontes</i>	20	44,53	3,57-1,21	2L	Cananéia-SP, S25°01'23''W47°54'27''

\*CTD- Média do comprimento diplóide

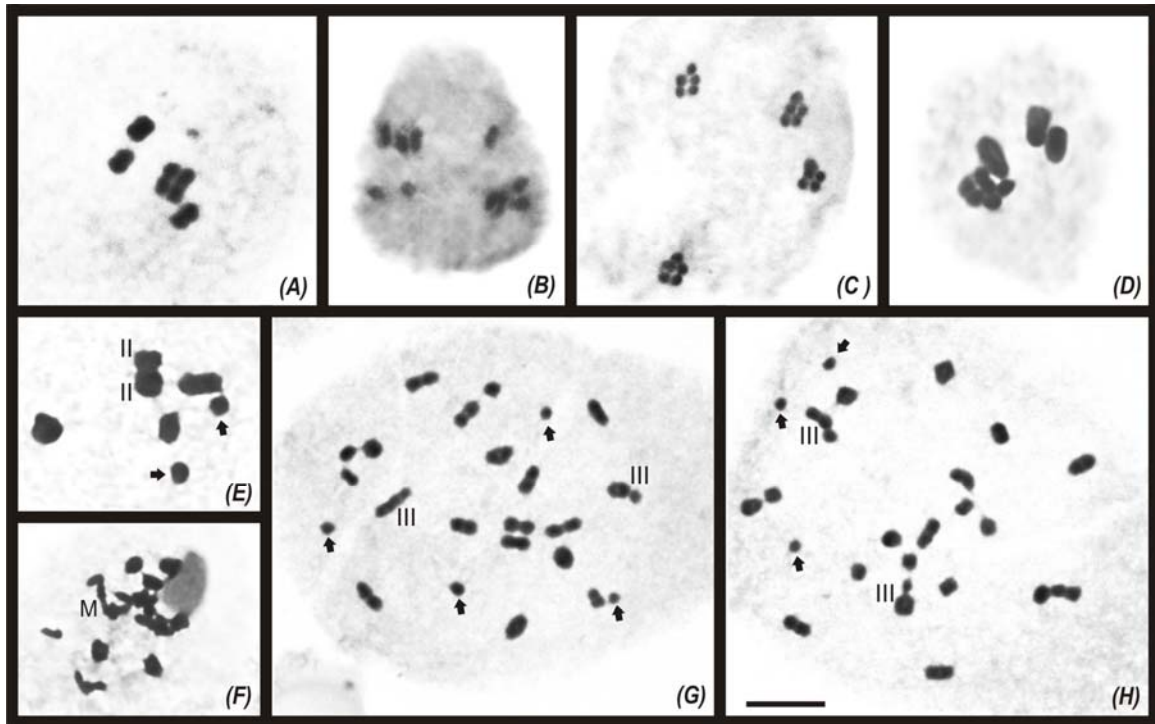
\*\*CM- Média do comprimento do maior cromossomo, Cm- Média do comprimento do menor cromossomo



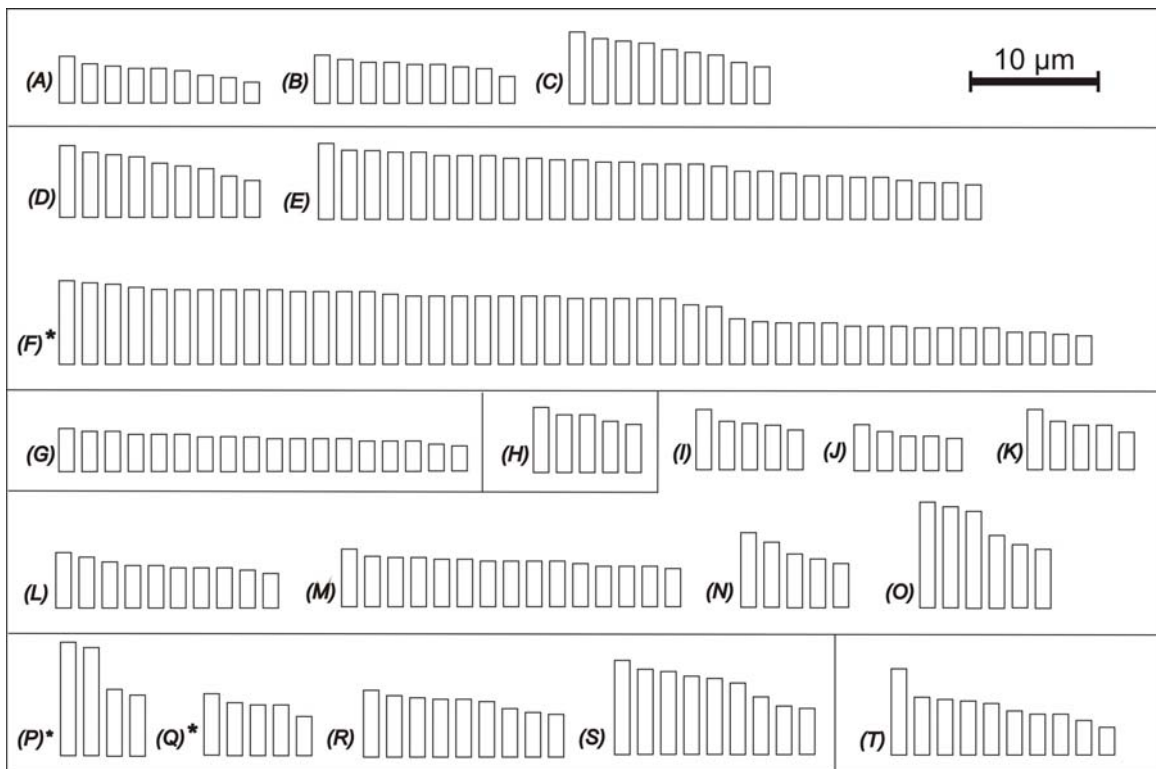
**Figura 1** – Metáfases e pró-metáfases em oito espécies de *Rhynchospora*. A) *R. asperula*  $2n = 18$ , B) *R. corymbosa*  $2n = 18$ , C) *R. gigantea*  $2n = 18$ , D-F) *R. globosa*  $2n = 36$ ,  $45$  e  $58$  respectivamente, G) *R. marisculus*  $2n = 36$  e H) *R. velutina*  $2n = 10$ . Barra =  $10\ \mu\text{m}$ .



**Figura 2** – Metáfases e pró-metáfases mitóticas em 12 espécies de *Rhynchospora*. A) *R. breviuscula*  $2n = 10$ , B) *R. ciliata*, C-E) *R. nervosa*  $2n = 10, 20$  e  $30$  respectivamente, F-G) *R. pubera*  $2n = 10$  e  $12$ , H e I) *R. tenuis*  $2n = 4$  e  $5$ , J) *R. junciformes*  $2n = 18$ , K) *R. austro-brasiliensis*  $2n = 18$  e L) *R. tenerrima*. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .



**Figura 3** – Meiose em espécies de *Rhynchospora*. A) *R. breviscula*  $2n = 10$ , B e C) *R. nervosa*  $2n = 10$ , D e E) *R. pubera*  $2n = 12$  e F) *R. globosa*  $2n = 36$  e G e H) *R. globosa*  $2n = 45$ . Setas= univalentes, II= bivalentes, III= trivalentes e M= multivalentes. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 4** – Idiogramas representando os cariótipos haplóides. A) *R. asperula*  $2n = 18$ , B) *R. corymbosa*  $2n = 18$ , C) *R. gigantea*  $2n = 18$ , D-F) *R. globosa*  $2n = 36, 58$  e  $45^*$  respectivamente, G) *R. marisculus*  $2n = 36$  e H) *R. velutina*  $2n = 10$ , I) *R. breviscula*  $2n = 10$ , J) *R. ciliata*, K-M) *R. nervosa*  $2n = 10, 20$  e  $30$  respectivamente, N e O) *R. pubera*  $2n = 10$  e  $12$ , P\* e Q\*) *R. tenuis*  $2n = 4$  e  $5$ , R) *R. junciformes*  $2n = 18$ , S) *R. austrobrasiliensis*  $2n = 18$  e T) *R. tenerrima*. Barra =  $10 \mu\text{m}$ . (\*) = Representação do cariótipo diplóide.

## REFERÊNCIAS

- Alves M, Araujo AC, Prata AP, Vitta F, Hefler S, Trevisan R, Gil ASB, Martins S, Thomas W (2009) Diversity of Cyperaceae in Brazil. *Rodriguésia* **60**:771-782.
- Bruhl JJ (1995) Sedge Genera of the World: Relationships and new classification of the Cyperaceae. *Australian Systematic of Botany* **8**:125-305.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, Pamphiliis CW (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* **16**:738-749.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2008) Chromosome reduction in *Eleocharis maculosa* (Cyperaceae). *Cytogenetic Genome Research* **122**:175-180.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Rego LNAA, Torezan JMD, Vanzela ALL (2008b) Cytogenetical and cytotaxonomical analysis of some Brazilian species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Australian Journal of Botany* **56**:82-90.
- Da Silva CRM, González-Elizondo MS, Vanzela ALL (2005) Reduction of chromosome number in *Eleocharis subarticulata* (Cyperaceae) by multiple translocations. *Botanical Journal of the Linnean Society* **149**:457-464.
- Da Silva CRM, Trevisan R, González-Elizondo MS, Ferreira JM, Vanzela ALL (2010) Kariotypic diversification and its contribution to the taxonomy of *Eleocharis* (Cyperaceae) from Brazil. *Australian Journal of Botany* **58**:46-60.
- Davies EW (1956) Cytology, evolution and origin of the aneuploid series in the genus *Carex*. *Hereditas* **42**:349-365.
- Furness CA, Rudall PJ (1999) Microsporogenesis in Monocotyledons. *Annals of Botany*. **84**:475-499.
- Goetghebeur P (1998) Cyperaceae. The Families and Genera of Vascular Plant IV. Flowering Plants-Monocotyledons. Berlin: Springer-Verlag.
- Govaerts R, Simpson DA, Bruhl JJ, Egorova T, Goetghebeur P, Wilson K (2007) 'World 13 checklist of Cyperaceae, Sedges.' Surrey: Kew Gardens.
- Greilhuber J (1995) Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In. 'Monocotyledons: Systematics and Evolution' (Eds. Rudall PJ, Cribb PJ, Culer DF, Humphries). Pp. 379-414. Kew:Royal Botanic Gardens.
- Hoshino T (1987) Karyomorphological studies in seven species of Japanese *Rhynchospora* (Cyperaceae). *La Kromosomo* **2**:1557-1561.

- Kükenthal G (1949) Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora. Botanische Jahrbücher Systematic* **74**:375-509.
- Kükenthal G (1950) Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora. Botanische Jahrbücher Systematic* **75**:27-195.
- Kükenthal G (1951) Vorarbeiten zu einer Monographie der Rhynchosporoideae. *Rhynchospora. Botanische Jahrbücher Systematic* **75**:273-314.
- Löve A, Löve, D, Raymond M (1957) Cytotaxonomy of *Carex* section Capillares. *Canadian Journal of Botany* **35**:715-761.
- Luceño M (1993) Cytotaxonomic studies in Iberian, Balearic, North African, and Macaronesian species of *Carex* (Cyperaceae). II. *Canadian Journal of Botany* **72**:587-596.
- Luceño M, Castroviejo S (1991) Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae). Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Plant Systematics and Evolution* **177**:149-159.
- Luceño M, Guerra M (1996) Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclatural proposal. *Caryologia* **49**:301-309.
- Luceño M, Vanzela ALL, Guerra M (1998) Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Canadian Journal of Botany* **76**:440-449.
- Nijalingappa BHM (1975) Diploid and tetraploid chromosome races in *Fimbristylis ovata* (Cyperaceae). *Cytologia* **40**: 55-560.
- Ohkawa T, Yokota M, Hoshino T (2000) Aneuploidal population differentiation in *Carex sociata* Boott (Cyperaceae) of the Ryukyu Islands, Japan. *Botanical Journal of the Linnean Society* **132**:337-358.
- Roalson EHA (2008) Synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. *Botanical Review* **74**:209-393.
- Strong MT (2006) Taxonomy and Distribution of *Rhynchospora* (Cyperaceae) in the Guianas, South America. *Department of Botany National Museum of Natural History*. Washington.
- Thomas WW (1984) The systematics of *Rhynchospora* section *Dichromena*. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **37**:1-116.
- Vanzela ALL, Colaço W (2002) Mitotic and meiotic behavior of  $\gamma$  irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Scientiarum* **24**:611-614.
- Vanzela ALL, Luceño M, Guerra M (2000) Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **134**:557-566.

- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M (2003) Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology* **26**:199-201.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceño M (1996) *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae): a species with the lowest number of holocentric chromosomes (n=2). *Cytobios* **88**: 219-228.
- Yano O, Hoshino T (2007) Karyomorphological studies of four species of Japanese *Scleria* (Cyperaceae). *Cytologia* **72**:275–278.

## CONCLUSÕES

- Nenhuma das 14 espécies estudadas apresentou de constrição primária corroborando com a presença de cromossomos holocêntricos no gênero *Rhynchospora*.
- *Rhynchospora aperula* com  $2n = 18$ , bem como os cariótipos de *R. nervosa* com  $2n = 10$ , *R. pubera* com  $2n = 12$ , *R. globosa* com  $2n = 36, 45$  e  $58$  e *R. tenuis* com  $2n = 5$ , foram pela primeira vez reportados.
- As seções *Dichromena*, *Eu-psilocaryae* e *Spermodontes* apresentaram espécies com números cromossômicos múltiplos de cinco ( $x = 5$ ), sendo este o número básico principal proposto para o gênero *Rhynchospora*, no entanto, as seções *Mariscalae*, *Longirostres*, *Tenuis* e *Pluriforae* apresentaram números cromossômicos múltiplos de seis ou nove ( $x = 6$  ou  $9$ ), que é considerado o número básico secundário para o gênero.
- Eventos de agmatoploidia provavelmente estiveram presentes na origem dos cariótipos das espécies *R. pubera* com  $2n = 12$  e *R. tenuis* com  $2n = 5$ .
- A variação intra-específica observada em *R. nervosa*,  $2n = 10, 20$  e  $30$ , deve-se provavelmente a eventos de poliploidização. Enquanto, a série cariotípica observada em *R. globosa* deve-se a eventos de poliploidização associados à disploidias.
- A poliploidia esteve presente em 64% das espécies estudadas. Dessa forma, os dados obtidos nesse trabalho, em conjunto aos disponíveis na literatura, apontam a poliploidia como o principal evento responsável pela evolução cariotípica nas espécies do gênero *Rhynchospora*.