



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLOS ROBERTO MAXIMIANO DA SILVA

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM REPRESENTANTES DO
GÊNERO *ELEOCHARIS* (CYPERACEAE)**

Londrina
2005

CARLOS ROBERTO MAXIMIANO DA SILVA

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM REPRESENTANTES DO
GÊNERO *ELEOCHARIS* (CYPERACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela

Londrina
2005

CARLOS ROBERTO MAXIMIANO DA SILVA

**ESTUDO CITOGENÉTICO EM REPRESENTANTES DO
GÊNERO *ELEOCHARIS* (CYPERACEAE)**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela Universidade
Estadual de Londrina

Profa. Dra. Berenice Quinzani Jordão Universidade
Estadual de Londrina

Profa. Dra. Neiva Izabel Pierozzi Instituto
Agrônômico de Campinas - IAC/ Campinas

Londrina, 22 de fevereiro 2005.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Anna, por sempre me apoiarem a me ajudarem em todos estes meus anos de estudos.

Aos meus avós, José e Janir, por tudo o que eles tem feito por mim.

A Renata minha namorada, em especial, pois sem ela tudo seria muito mais difícil.

E ao meu orientador e amigo André, pela confiança e a oportunidade de trabalhar com ele e por me mostrado um novo caminho da ciência, além do caminho de alguns bares!!!!.

Ao meu grande irmão (literalmente), Fernando, pelos momentos de descontração e festas neste últimos anos e ao Wilson, Turuna e Gholst (os gordinhos), pelas festas, conversas.

Aos meus amigos, tanto os antigos quanto os novos.

A todos os professores que me ajudaram em especial ao José Marcelo, a Leda, Silvia e Lúcia.

A todos do LABRE, pelo auxílio neste trabalho e pelo agradável ambiente de trabalho, em especial ao Jeferson, Juan, Thiago e Marquinho.

A Universidade Estadual de Londrina, ao Centro de Ciências Biológicas, ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. E a Suely.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

SILVA, Carlos R. M. **Estudo Citogenético em Representantes do Gênero *Eleocharis* (Cyperaceae)**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

RESUMO

O gênero *Eleocharis* (Cyperaceae) apresenta cerca de 600 espécies distribuídas desde os trópicos até os pólos porém, ocupa preferencialmente a área tropical das Américas. *Eleocharis* é reconhecido em Cyperaceae pela inflorescência única sem brácteas involucrais. As características citológicas como, cromossomos holocêntricos, meiose pós-reducional, ausência de tétrades e cariótipos reorganizados por agmatoploidia, simplíndia e poliploidia são compartilhadas por todos os representantes desta família. Estudos citogenéticos descrevem uma considerável variação no tamanho e no número cromossômico deste gênero. As espécies mostram cariótipos variando de $2n = 10$ a $2n = ca. 196$, com número básico $x=5$. Variações no número e posicionamento de bandas C-CMA₃/DAPI e na quantidade de sítios de DNAr 45S localizados por FISH sempre nas extremidades dos cromossomos, características encontradas nas espécies desta família. Neste trabalho os cariótipos de 24 populações de 12 espécies de *Eleocharis* (Cyperaceae) foram analisados. Todas as espécies mostraram cromossomos holocêntricos já que não foram observadas contrações primárias. Os números cromossômicos variaram de $2n = 6$ em *E. subarticulata* a $2n = 54$ em *E. acutangula*. Para *E. subarticulata* que possui um número cromossômico reduzido ($n=3$), característica pouco comum nos vegetais, foi analisado o comportamento meiótico, que foi pós-reducional. Bandamento C-CMA₃/DAPI foi realizado em sete espécies. Todas mostraram bandas CMA₃⁺ nas extremidades dos cromossomos e em apenas poucos pares. Apenas *E. sellowiana* apresentou bandas DAPI terminais em alguns cromossomos. FISH com a sonda de DNAr 45S foi feito em cinco espécies e, com exceção de *E. flavescens* e *E. sellowiana* com dez marcações terminais, as outras apresentaram quatro marcações. A hibridação com sonda telomérica realizada em *E. subarticulata* marcou todas as extremidades dos seis cromossomos e dois mostraram marcações intersticiais. A maioria das espécies estudada pertence à seção *Eleocharis*, que contém a maior variação cariotípica. Na seção *Eleogenus* as espécies estudadas foram confirmadas como poliplóides. Na seção *Limnochloa* as espécies analisadas exibiram cromossomos pequenos e numerosos, características da seção. Estes resultados indicam que a poliploidia é o evento evolutivo mais importante na diferenciação dos cariótipos deste gênero e, em algumas espécies os cariótipos foram diferenciados por agmatoploidia e simplíndia.

Palavras-chave: Agmatoploidia. Cyperaceae. Citogenética. *Eleocharis*. Hibridação *in situ*. Holocêntrico. Poliploidia. Simplíndia.

SILVA, Carlos R. M. **Estudo Citogenético em Representantes do Gênero *Eleocharis* (Cyperaceae)**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

ABSTRACT

The *Eleocharis* genus (Cyperaceae) comprises about 600 species, distributed from tropics to poles, occurring preferentially in tropical areas of America. *Eleocharis* is distinguished in the Cyperaceae family because it possess unbranched and leafless culms, with basal sheaths and a single and highly condensed terminal spikelet. Cytogenetical features as holocentric chromosomes, absence of tetrad and karyotypes reorganized by agmatoploidy, symploidy and poliploidy are shared by all the representatives of this family. Cytogenetical studies has been show important variation in size and number of chromosomes. The chromosome number in the genus *Eleocharis* ranged from $2n = 10$ to $2n = ca. 196$, with basic number $x=5$. Cyperaceae commonly show both variation in the number and position of bands C-CMA3/DAPI, and quantity the 45S rDNA sites highlighted by FISH, allways in chromosome ends. Karyotypes were analysed in 24 populations of 12 species of *Eleocharis* (Cyperaceae) in this study. All the species show holocentric chromosomes as long as constrictions were not observed in the chromosomes. The chromosome number varied from $2n=6$ in *E. subarticulata* $2n = 54$ in *E. acutangula*. Karyotype of *E. subarticulata* presented reduced chromosome numbers ($n=3$), wich is a uncommon feature in plants. Their meiotic behaviour were described, showing that it is post-reductional. The C-CMA₃/DAPI banding was performed in seven species. All showed CMA₃⁺ bands in the terminal regions of chromosomes, but in few pairs. Only *E. sellowiana* showed DAPI terminal bands in few chromosomes. FISH was performed with rDNA 45S probe in five species, and in exception of *E. flavescens* and *E. sellowiana*, whith ten labelling terminal sites, the others showed four labelling terminal sites. Hybridization was performed with telomeric probe in *E. subarticulata*, labelling all terminal sites in the six chromosomes but showing two with interstitial sites. In the section *Eleogenus* all the species were polyploids. In the section *Limnochloa* the species analyses showed small and numerous chromosomes, characteristic of this section. This results point that polyploidy is evolution event more important for karyotypic differentiation for this genus, and in some species the karyotype were differentiated by agmatoploidy and symploidy.

Keywords: Agmatoploidy. Cyperaceae. Cytogenetic. *Eleocharis*. Holocentric. Hybridization in situ. Poliploidy. Symploidy.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Introdução.

- Figura 1** – Ambiente aquático onde são encontrados os representantes do gênero *Eleocharis*. a) *E. interstincta*, b) *E. flavescens*, c) *E. sellowiana* 14
- Figura 2** – Figura 2. A) Raiz cespitosa em *E. montana*, B) raiz rizomatosa em *E. flavescens*, C) corte transversal em colmo de *E. tenuis*, D) corte longitudinal em colmo de *E. montana*, mostrando septos transversais presentes no interior do canal de ar. A seta indica o ápice mucronado da bainha superior, E) Corte transversal à esquerda no colmo de *E. obtuse-trigona*. A seta indica o ápice acuminado da bainha superior no colmo de *E. obtuse-trigona*, vista lateral 15
- Figura 3** – Desenhos de diferentes espiguetas em várias espécies de *Eleocharis*, ilustrando a variação na forma e no tamanho 17
- Figura 4** – Desenhos mostrando a variação na forma e no tamanho dos aquênios em algumas espécies de *Eleocharis* 18
- Figura 5** – Fotografias de aquênios em *Eleocharis*. A) *E. debilis*. A seta aponta a cerda periântica com o mesmo tamanho do corpo do aquênio. B) *E. interstincta*. A seta aponta a cerda periântica maior que o comprimento do corpo do aquênio. C) *E. mutata*. A seta aponta a cerda periântica muito maior que o comprimento do corpo do aquênio. D) *E. mínima*. A seta aponta a cerda periântica menor que o comprimento do corpo do aquênio. Observe ainda as diferenças na forma da base do estilo e na coloração dos frutos 19
- Figura 6** – Anficárpia em *E. mínima*. A seta indica um fruto, "aquênio" 20
- Figura 7** – A) Inflorescência de *Eleocharis sp.* B) Inflorescência de *E. montana*. A seta indica um estame com seu longo filete 21
- Figura 8** – A) Metáfase em *E. flavescens*. A seta mostra um cromossomo sem constrição primária. B) Anáfase mitótica em *Rynchospora tenuis*. As setas apontam as cromátides migrando paralelamente. C) Metáfase I em *R. cephalotes*. Observe os bivalentes formando estruturas em "caixa" 24

Capítulo 2 – Análise Citogenética em representantes Brasileiros do gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae juss.)

Figura 1 –Fotos de metáfases de *Eleocharis* estudadas. A) *E. subarticulata* (2n=6). B) *E. maculosa*. C) *E. flavescens* (2n=10). D) *E. radicans* (2n=10). As setas apontam as constrições nucleolares terminais. E) *E. minima* (2n=12). As setas apontam os menores cromossomos. F) *E. sellowiana* (2n=20). As setas apontam os satélites. G) *E. geniculata* (2n=20). H) *E. retroflexa* (2n=10). A seta aponta uma constrição nucleolar terminal. I) *E. retroflexa* (2n =30). As setas apontam os maiores cromossomos. J) *E. montana* (2n=40). K) *E. elegans*. L) *E. brasiliensis* (2n=ca.50). M) *E. acutangula* (2n=54). As setas apontam as constrições nucleolares terminais. A barra = 13,5 μm 45

Figura 2 –Fotos com coloração CMA₃/DAPI. A) *E. flavescens* (2n=10). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. B) *E. retroflexa* (2n=30). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. C) *E. sellowiana* (2n=20). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. D) *E. geniculata* (2n=20). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. E) *E. elegans* (2n=40). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. F) *E. montana*. As setas indicam as bandas CMA₃⁺. G) *E. acutangula* com varias marcações CMA₃⁺. H) *E. sellowiana* exibindo várias marcações DAPI+ nas extremidades de vários cromossomos. A barra = 10 μm . As fotos E e F estão com o dobro de ampliação em relação as demais fotos 46

Figura 3 –Fotos de Híbridação *in situ* com a sonda DNAr 45S A) *E. flavescens* (2n=10) com 10 sítios terminais. B) *E. maculosa* (2n=10) com quatro sítios. C) *E. sellowiana* (2n=20) com 10 sítios terminais, a foto mostra vários núcleos marcados. D) *E. geniculata* (2n=20) com quatro sítios marcados. As setas indicam os dois menores sítios. E) *E. montana* (2n=40) com quatro sítios. A barra = 13,5 μm 47

Capítulo 3 – *Eleocharis subarticulata* (Nees) Boeckl: uma espécie de Cyperaceae com número cromossômico reduzido (n=3).

Figura 1 –A) pró-metáfase de *E. subarticulata*. B) Marcações CMA₃⁺. As setas indicam as regiões ricas em CG. C) Hibridação com sonda de DNAr 45S. A seta indica a metáfase com os quatro sítios terminais. D) Hibridação com sonda de telômero. A seta indica ausência de telômero, decorrente do sítio de DNAr 45S. E) Metáfase com cromossomos marcados com a sonda de telômero. As setas indicam as marcações intersticiais nos cromossomos maiores 63

Figura 2 –A e B) Paquíteno. A seta indica a ponta de um cromossomo. C, D, E e F) Diplóteno. As setas indicam associação entre os cromossomos. G e H) Metáfase I. I) Diacinese. J) Anáfase I. K e L) Metáfase II. M e N) Mitose polínica 64

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Introdução.

Tabela 1 – Comparação das classificações infragenéticas para o gênero *Eleocharis* 14

Capítulo 2 – Análise Citogenética em representantes Brasileiros do gênero *Eleocharis* R. Br.
(Cyperaceae juss.)

Tabela 1 – Contagem cromossômica previamente publicadas no gênero *Eleocharis* . * Indica as espécies que tiveram seus números cromossômicos contados pela primeira vez e as medidas cromossômicas com o local de cada população 38

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TAXONÓMICOS DE <i>ELEOCHARIS</i>	12
1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE <i>ELEOCHARIS</i>	21
1.3 LOCALIZAÇÃO DE DNA REPETITIVOS	24
1.4 OBJETIVOS	26
1.4.1 Objetivo Geral	26
1.4.2 Objetivos Específicos	26
2 CAPÍTULO 2 – ANÁLISE CITOGENÉTICA EM REPRESENTANTES BRASILEIROS DO GÊNERO <i>ELEOCHARIS</i> R. BR. (CYPERACEAE JUSS)	28
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3 CAPÍTULO 3 – <i>ELEOCHARIS SUBARTICULATA</i> (NEES) BOECKL: UMA ESPÉCIE DE CYPERACEAE COM NÚMERO CROMOSSÓMICO REDUZIDO (N=3)	48
3.1 INTRODUÇÃO	50
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4 CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E TAXONÓMICOS DE *ELEOCHARIS*

A família *Cyperaceae* está dividida em duas subfamílias: Cyperoideae e Caricoideae. A subfamília Cyperoideae está subdividida nas tribos Cypereae com 17 gêneros, Scirpeae com 27, Abildgaardieae com 7 e Arthrostylideae com 3. A subfamília Caricoideae está dividida nas tribos Rhynchosporeae com 4 gêneros, Schoeneae com 27, Cryptangieae com 5, Trilepideae com 4 e Hypolyreae com 14 gêneros (BRUHL 1995).

O gênero *Eleocharis* R. Br. pertence à tribo Scirpeae e contém cerca de 600 espécies distribuídas desde os trópicos até os pólos, porém, seus representantes ocorrem preferencialmente nas Américas (SVENSON 1929, 1932, 1934, 1937, 1939, GONZÁLES-ELIZONDO; PETERSON 1997) e, de acordo com estes dois últimos autores, dois terços das espécies descritas são prováveis sinonímias. *Eleocharis* é um gênero natural que fazia parte do gênero *Scirpus* L., sendo separado deste por Brown (1810, *apud* FARIA 1998). Essa separação foi justificada pelo fato de *Eleocharis* possuir uma única inflorescência sem brácteas involucrais no ápice do colmo, e a base do estilete persistente, endurecida, dilatada e articulada com o ovário (FARIA 1998).

Torrey (1836), organizou o gênero *Eleocharis* em 7 subgêneros, considerando as espécies da América do Norte. Koyama (1961) moveu *E. margaritaceae* e *E. parvula* do gênero *Scirpus* para *Eleocharis* e introduziu uma nova seção, a Seção *Pauciflorae* em *Eleocharis*. Porém Kunth (1937, *apud* GONZÁLES-ELIZONDO; PETERSON 1997), baseado no trabalho de Nees (1834, 1835), dividiu o gênero em três grupos sem hierarquia definida: *Eleocharis Eleocharis* (incluindo *Eleocharis*, *Chaetocyperus* Nees e *Scirpidium* Nees), *E. Eleogenus* e *E. Limnocharis* Kunth.

Ao longo dos anos várias espécies de *Eleocharis* foram descobertas e novas classificações deste gênero foram elaboradas e modificadas. Uma das mais completas classificações já realizadas foi feita por Svenson (1929, 1934, 1937, 1939), que organizou o gênero apenas em séries, o que, segundo Kukkonen (1990), difere do tratamento dado a outros gêneros da família.

Além disso os nomes propostos para as séries foram adotados sem a citação de seus respectivos autores, resultando em freqüentes confusões nos trabalhos posteriores.

Segundo a autora supracitada, o gênero vem sendo mais freqüentemente tratado sem qualquer divisão infragenérica, mas em seu tratamento de *Eleocharis* para a Flora Iranica, essa autora reconheceu cinco subgêneros, 13 seções e três séries.

A classificação mais recente para o gênero foi realizada por Gonzáles-Elizondo e Peterson (1997). Os autores aceitaram, com algumas modificações, quatro dos subgêneros de Kukkonen (1990), e apresentaram um sistema com quatro subgêneros (Zinserlingia, *Eleocharis*, *Limnochloa* e *Scirpidium*), sete seções, oito séries e sete subséries. Esta última classificação foi adotada para este trabalho e as modificações infragenéticas realizados por Koyama (1961), Svenson (1939) e Gonzáles-Elizondo e Peterson (1997) estão simplificadas na Tabela 1.

O nome *Eleocharis* é derivado de duas palavras gregas que significam "brejo" e "graça", em referência à beleza e ao ambiente aquático em que elas ocorrem como: lagos, lagoas, brejos, margens de rios, pântanos, restingas, cachoeiras, águas rasas e solos úmidos de locais abertos ou no interior de matas (FARIA 1998, Figura 1). Segundo Svenson (1929, 1932, 1934, 1937, 1939), as espécies podem ter hábito cespitoso, rizomatoso ou estolonífero (Figura 2A e 2B). De acordo com Bruhl (1995), as espécies que ocorrem na região sudeste e sul do Brasil são, em geral, estoloníferas, havendo também algumas espécies rizomatosas e outras exclusivamente cespitosas. Nas ciperáceas em geral, o caule é chamado colmo, sendo este geralmente sólido, freqüentemente 3-angulado, podendo ser ramificado ou simples (MOHLENBROCK 1976). Em *Eleocharis*, o colmo é um escapo que em secção transversal pode apresentar três ou mais ângulos, ou ainda ser redondo a elíptico, e com função fotossintetizante (UENO; TAKEDA 1992). Cada colmo ereto que sai do rizoma de *Eleocharis* é um ramo terminal que possui duas bainhas: a inferior é frouxa e membranácea e mais fendida, enquanto a superior é um cilindro envolvendo o colmo (Figura 2C, D, E).

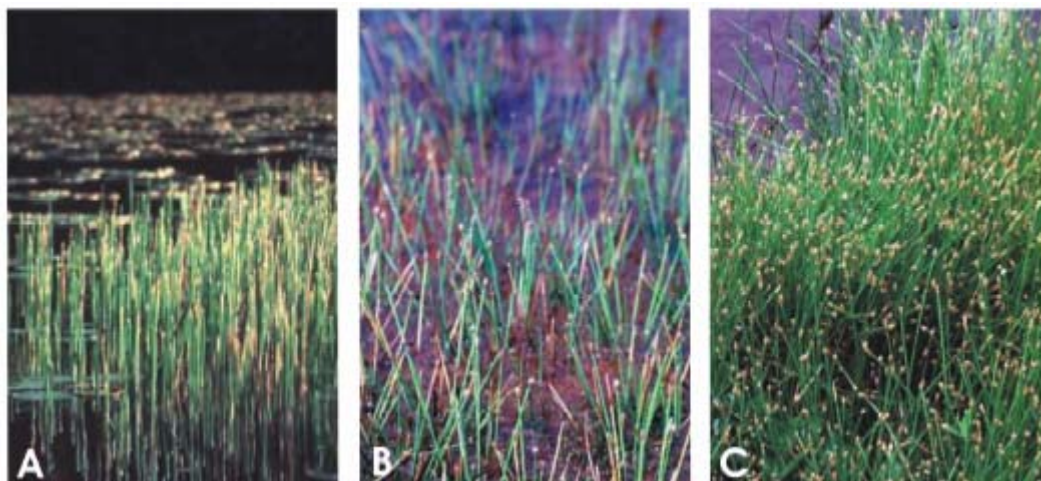


Figura 1 – Ambiente aquático onde são encontrados os representantes do gênero *Eleocharis*. a) *E. interstincta*, b) *E. flavescens*, c) *E. sellowiana*.

Tabela 1 – Comparação das classificações infragenéticas para o gênero *Eleocharis*

Koyama (1961)	Svenson (1939)	González-Elizondo e Peterson (1997)
Sec. Limnochloa	Ser. Mutatae	Subg. Limnochloa
Sec. Pauciflorae	Ser. Pauciflorae	Sec. Limnochloa
		Subg. Zinserlingia
		Sec. Disciformes
		Sec. Baeothryon
		Subg. Eleocharis
		Sec. Parvulae
Sec. Eleocharis		Sec. Eleocharis
Ser. Eleocharis	Ser. Palustriformes	Ser. Rostellatae
	Subser. Palustres	Ser. Eleocharis
	Subser. Truncatae	Subser. Eleocharis
		Subser. Truncatae
		Subser. Acutae
Ser. Multicaules	Ser. Multicaules	Ser. Multicaules
		Ser. Albidae
		Ser. Melanocarpae
		Ser. Tenuissimae
	Ser. Sulcatae	Subser. Sulcatae
Ser. Chaetariae	Ser. Tenuissimae	Subser. Chaetariae
		Sec. Eleogenus
Ser. Ovatae	Ser. Ovatae	Ser. Ovatae
	Ser. Maculosae	Ser. Maculosae
	Subser. Rigidae	Subser. Rigidae
	Subser. Ocreatae	Subser. Ocreatae
Ser. Aciculares	Ser. Aciculares	Subg. Scirpidium
		Sec. Scirpidium

Fonte: Yano *et al.* (2004)

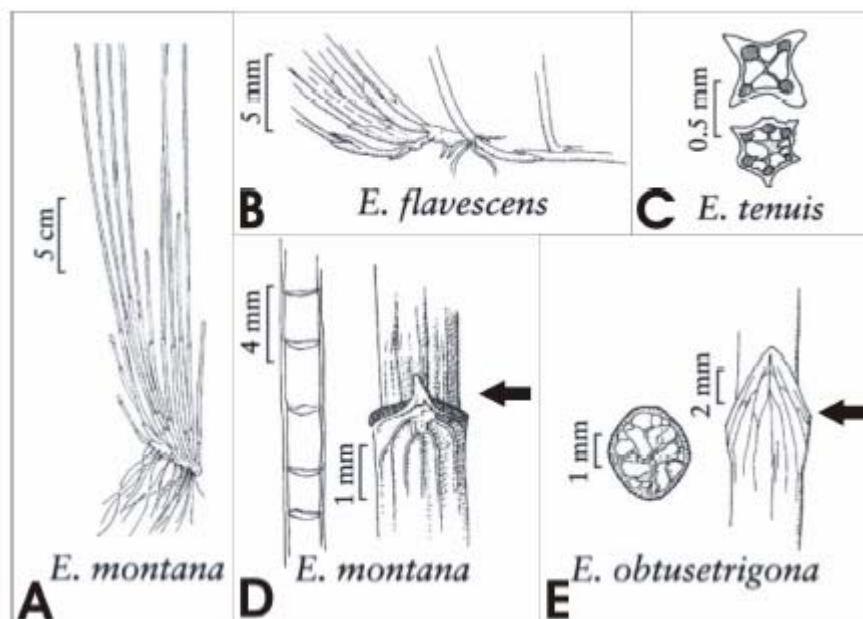


Figura 2 – A) Raiz cespitosa em *E. montana*, B) raiz rizomatosa em *E. flavescens*, C) corte transversal em colmo de *E. tenuis*, D) corte longitudinal em colmo de *E. montana*, mostrando septos transversais presentes no interior do canal de ar. A seta indica o ápice mucronado da bainha superior, E) Corte transversal à esquerda no colmo de *E. obtusetrigona*. A seta indica o ápice acuminado da bainha superior no colmo de *E. obtusetrigona*, vista lateral .

Segundo Walters (1950), sob a bainha inferior ocorre uma gema axilar, que eventualmente se desenvolve em uma ramificação do rizoma. A forma do ápice da bainha superior é um caráter de grande importância na taxonomia. De acordo com Mohlenbrock (1976), as folhas de Cyperaceae são normalmente compostas por uma lâmina e uma bainha. Em *Eleocharis* a lâmina é reduzida e as folhas são constituídas por apenas uma bainha que envolve uma porção do colmo (FARIA 1998).

A inflorescência de Cyperaceae é freqüentemente composta por uma ou mais brácteas involucrais. Em *Eleocharis*, entretanto, não ocorrem estes involúncros sendo esta uma das características que define o gênero. Esta inflorescência única no ápice do colmo é chamada de espiguetta (Figura 3). As glumas estéreis, quando presentes, são sempre basais e seu número varia conforme a espécie, sendo geralmente de uma a três. As glumas basais estéreis podem ser ou não diferenciadas das glumas férteis e às vezes são relativamente persistentes.

Segundo Blake (1939), caracteres como a forma das glumas, a presença ou a ausência de quilhas nestes órgãos, não são sempre constantes, podendo variar dentro de uma mesma inflorescência. A espiguetta pode ser variável em tamanho e forma entre as espécies,

mas relativamente constante para cada espécie. O número de estames e a forma das anteras, para flores de *Eleocharis* são bastante constantes em algumas espécies (FARIA 1998).

Algumas indefinições existem com relação à morfologia dentro de *Eleocharis*, uma delas relaciona-se com as características dos frutos e suas denominações. Estes são chamados de aquênios por Svenson (1929, 1932, 1934, 1937,1939), de cipselas por Spjut (1994), e de núculas por Kukkonen (1990). O termo aquênio é definido como um fruto com pericarpo indeiscente, contínuo com a semente. E cipsela como um antocarpo simples, com cerdas ou outras estruturas similares que se estendem acima da região apical do pericarpo.

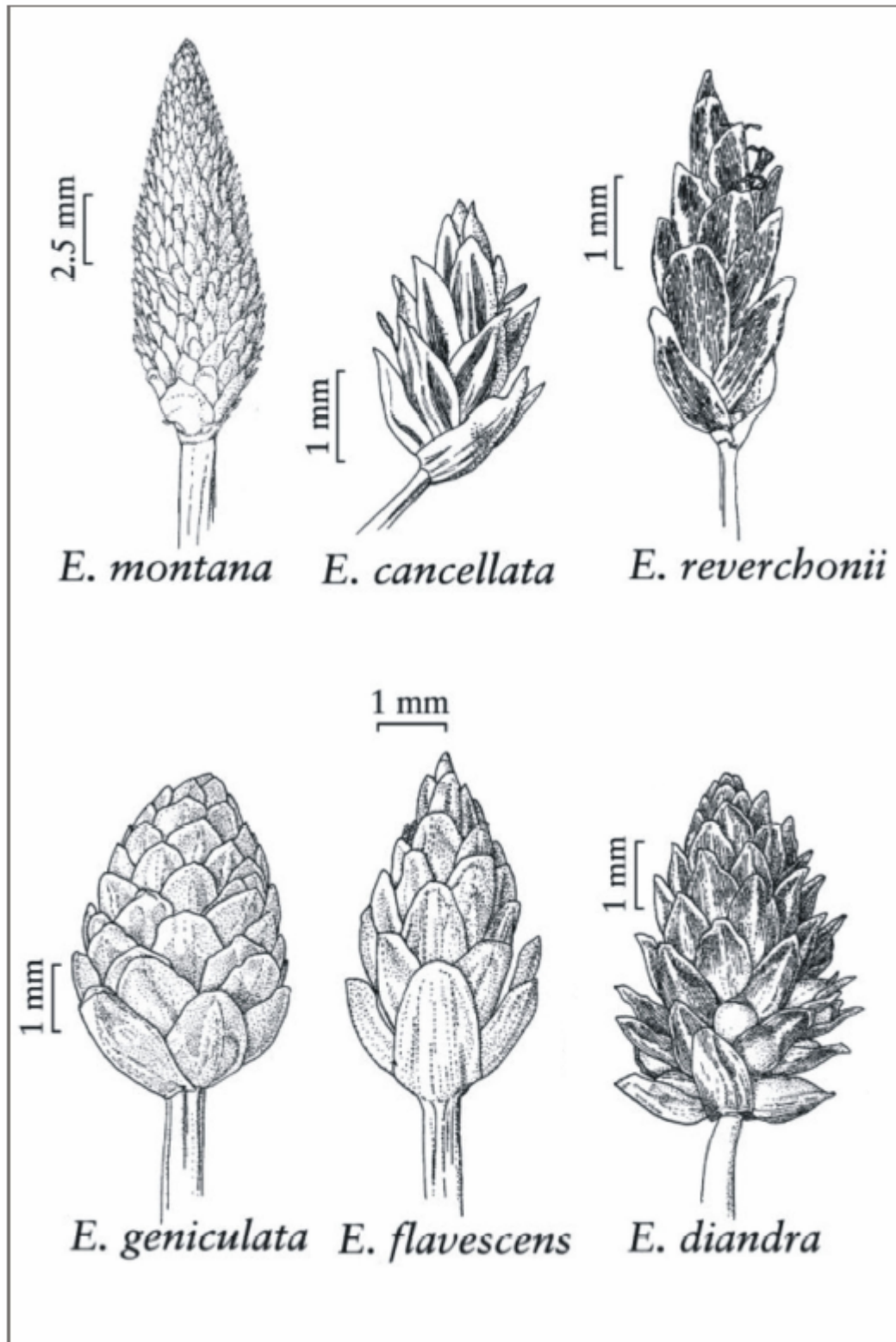


Figura 3 – Desenhos de diferentes espiguetas em várias espécies de *Eleocharis*, ilustrando a variação na forma e no tamanho.

Segundo Spjut (1994), o termo cipsela tem sido utilizado para definir o fruto de *Asteraceae*, que difere de um aquênio pela existência de uma camada adicional (pappus) sobre o pericarpo, devido à posição do ovário, que é ínfero. Por fim, o autor afirma que o termo aquênio deve ser restrito apenas para os frutos de *Asteraceae* que não possuem pappus. Entretanto, muitos pesquisadores têm ignorado esta distinção, e continuam a utilizar o termo aquênio para os frutos em *Cyperaceae* de um modo geral (veja a Figura 4). De acordo com Svenson (1929, 1939), as características morfológicas mais importantes na diferenciação das espécies de *Eleocharis* encontram-se nos aquênios, na forma e na coloração da base do estilete, bem como no tamanho e no número de cerdas periânticas, daí a grande importância em denominá-lo corretamente. Um das características mais importantes do fruto é a ornamentação da superfície. Esta é criada por depósito de ceras e cutícula formando pequenas estruturas chamadas paredes periclinais (MENAPACE 1991). A Figura 5 mostra a variedade de aquênios em quatro espécies encontradas no centro-sul do Brasil.

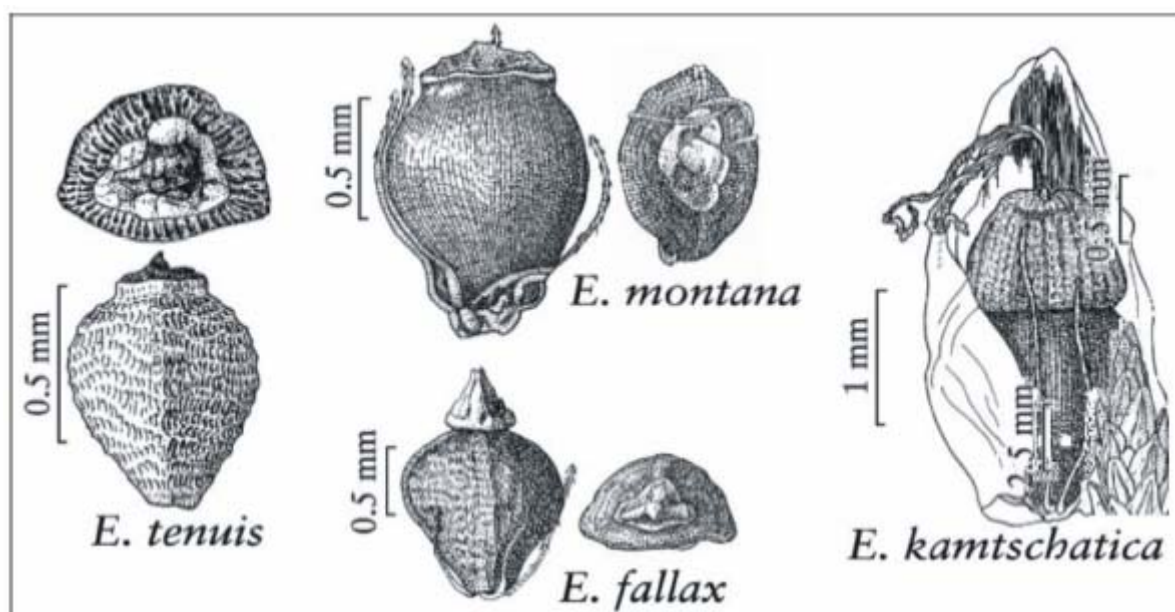


Figura 4 – Desenhos mostrando a variação na forma e no tamanho dos aquênios em algumas espécies de *Eleocharis*.



Figura 5 – Fotografias de aquênios em *Eleocharis*. A) *E. debilis*. A seta aponta a cerda periântica com o mesmo tamanho do corpo do aquênio. B) *E. interstincta*. A seta aponta a cerda periântica maior que o comprimento do corpo do aquênio. C) *E. mutata*. A seta aponta a cerda periântica muito maior que o comprimento do corpo do aquênio. D) *E. mínima*. A seta aponta a cerda periântica menor que o comprimento do corpo do aquênio. Observe ainda as diferenças na forma da base do estilo e na coloração dos frutos.

Além de frutos produzidos em infrutescências no ápice do colmo, frutos basais também podem ocorrer em algumas espécies de *Eleocharis* (como, por exemplo, na espécie anficárpica *E. caespitosissima*). Anficárpia é o termo que define a produção de frutos aéreos e basais, sendo os basais considerados tanto os que ocorrem solitários na axila da bainha inferior ou próximo ao solo (FARIA 1998) (figura 6). Bruhl (1994) afirma que a anficárpia é importante para dar maior proteção à semente durante períodos de perturbações, apesar de que na maioria das espécies de *Eleocharis* a semente está protegida dentro do aquênio endurecido.

A polinização é anemófila, como na maioria das Cyperaceae. Em geral, as espécies apresentam redução das características de atração e recompensa a visitantes. Por outro lado, produzem grande quantidade de grãos de pólen, freqüentemente pequenos, e que devem ser tão rápida e livremente distribuídos pelo ar quanto possível. Dessa forma, o número de estames em plantas anemófilas é geralmente grande, e as anteras encontram-se freqüentemente expostas, elevadas para fora da flor por filetes longos e flexíveis, com pedicelo móvel (Figura 7). O estigma é geralmente plumoso e grande, ficando exposto para aumentar a probabilidade de contato com os grãos de pólen.



Figura 6 – Anficárpia em *E. mínima*. A seta indica um fruto, "aquênio"

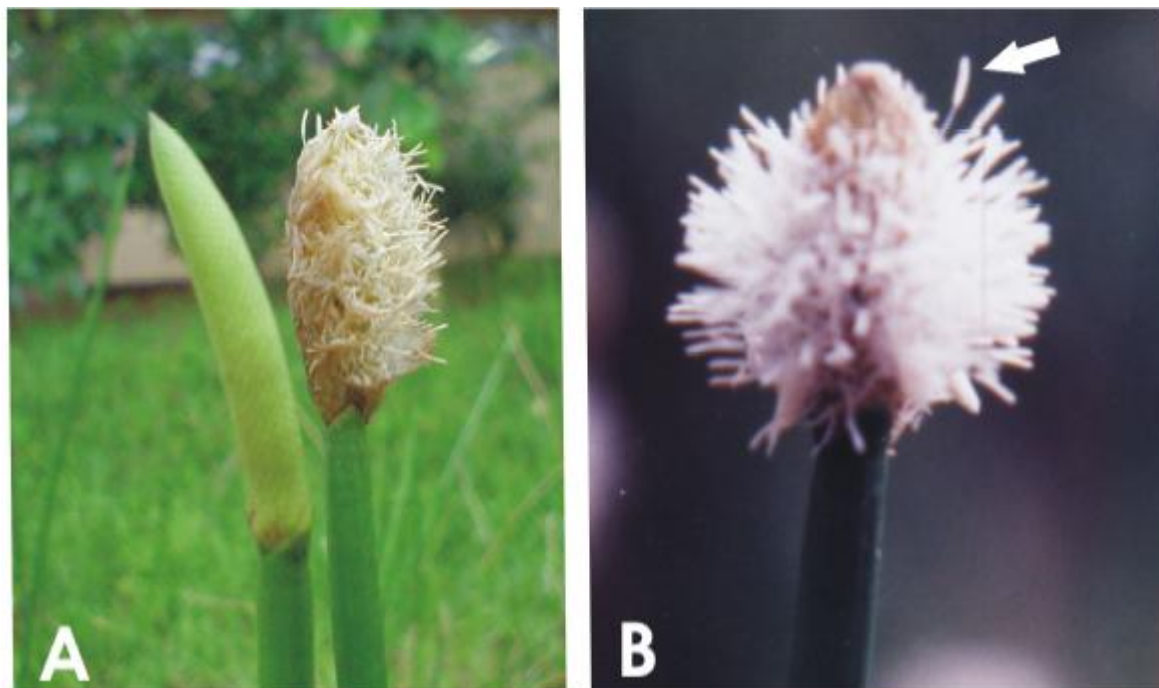


Figura 7 – A) Inflorescência de *Eleocharis* sp. B) Inflorescência de *E. montana*. A seta indica um estame com seu longo filete.

1.2 ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE *ELEOCHARIS*

Estudos citogenéticos em *Eleocharis* datam de antes de 1924, quando Piech descreveu o número de cromossomos de *E. prostrata* (veja NIJALINGAPPA 1973). Atualmente, a literatura tem registrado uma considerável variação no número e no tamanho cromossômico de espécies deste gênero, sendo de $2n = 10$ (LEWIS *et al.* 1962) e c.a. 196 (HOSHINO 1987). Variações intraespecíficas têm sido apontadas em algumas populações de *E. geniculata*, com $2n = 10$ e 20 (SANYAL; SHARMA 1972, NIJALINGAPPA, 1973), *E. palustris* com $2n = 15$ e 16 (STRANDHEDE 1965) e *E. acicularis* f. *longiseta*, $2n = 20$ e 21, sendo que esta última foi considerada por Yano *et al.* (2004) como um mixoplóide provavelmente originado por fragmentação de um cromossomo do cariótipo contendo $2n = 20$. Este tipo de fragmentação também pode ter originado um mixoplóide em *E. atropurpurea* com $2n = 20$ e 21 (NIJALINGAPPA 1973). Løve *et al.* (1957) propuseram $x = 5$ como o possível número básico para Cyperaceae, o que também foi aceito por Vanzela *et al.* (2000).

Outra característica comum aos membros da família Cyperaceae é a ausência de centrômero localizado em seus cromossomos. Tais cromossomos foram descritos primeiramente em insetos (SCHARADER 1935), sendo que somente em 1954 este tipo de

cromossomo foi descrito no gênero *Eleocharis* por Battaglia e Håkansson (veja STRANDHED 1965). Porém, existe uma discordância na denominação destes cromossomos para *Eleocharis*. Autores como Håkansson (1958), Hoshino (1987) e Vanzela *et al.* (1996) o denominam cromossomos Holocêntricos, porém há autores que sugerem que estes sejam cromossomos Policêntricos (BERNARDINI 1959). Apesar do nome holocêntrico ser erroneamente empregado (holo=tudo, cêntrico=centro) porém esta denominação é amplamente aceita e utilizadas, o termo correto seria holocinético (holo=tudo, cinético=atividade cinética), pois não existe centrômero distribuído ao longo de cromossomo mais sim uma atividade cinética, onde as fibras do fuso tracionam estes cromossomos.

As características que os cromossomos com cinetócoro difuso possuem, são: (i) a falta de uma constrição primária visível (Figura 8A), contendo ou não constrições nucleolares (VANZELA *et al.* 2000; WESTERMAN; COLLET, 1984; GUAGLIANONE *et al.*, 2000) e (ii) uma extensa atividade cinética ao longo dos cromossomos em anáfase (Harms 1968), fazendo que estes migrem paralelos uns aos outros no eixo da placa equatorial (Figura 8B).

Cromossomos com cinetócoro difuso quando natural ou artificialmente fragmentados, segregam normalmente durante o ciclo celular. Isto foi demonstrado por Castro *et al.* (1949) em *Luzula purpurea* (Juncaceae), por Håkansson (1954) em *Eleocharis palustris* (Cyperaceae) e em *Rhynchospora pubera* (VANZELA; COLAÇO 2002). De acordo com estes autores, o material biológico foi irradiado com raios γ ou X, alterações no número e no tamanho dos cromossomos foram detectadas, mas o comportamento dos cromossomos fragmentados, bem como dos fragmentos gerados foi normal. Em *Drosera* (Droseraceae), outro gênero que possui cromossomos com cinetócoro difuso, espécies foram irradiadas com raios gama e como resultado, ocorreram fragmentações cromossômicas, também com comportamento normal (SHEIKH *et al.* 1995).

Acredita-se que a evolução dos cariótipos da família Cyperaceae ocorra através do mecanismo de agmatoploidia (quebra) e simplóidia (fusão) nos cromossomos holocêntricos, devido a uma extensa documentação no gênero *Carex*, o maior em número de espécies estudadas (DAVIES, 1956; FAULKNER, 1972; LUCENO; CASTROVIEJO, 1991). As terminologias agmatoploidia, para fissão cromossômica e simplóidia, para fusão cromossômica, em holocêntricos, foi revista e proposta por Luceno e Guerra (1997).

De acordo com Vanzela *et al.* (2000) cerca de 59% das espécies estudadas de *Rhynchospora* é poliplóides, sendo que em poucas espécies, como exemplo, *R. tenuis* (VANZELA *et al.*, 1996) e *R. cephalotes* (LUCENO *et al.*, 1998), agmatoploidia e simplóidia

foram detectadas. Isto torna a poliploidia o evento mais importante neste grupo do que em *Carex*. A evolução cariotípica para gênero *Eleocharis* parece seguir o padrão de *Rhynchospora*, pois a maioria das espécies estudadas são poliplóides. No entanto, algumas espécies apresentam variações numéricas inter e intra-específicas como em *E. atropurpurea* $2n = 20$ e 21 e *E. kamtschatica* $2n = 44$ e 46 (veja YANO *et al.*, 2004). De acordo com estes autores, estes dois tipos de cariótipos foram originados por fusão e fragmentação cromossômica, respectivamente.

Apesar da existência de cinetócoro difuso ao longo dos cromossomos em mitose Strandhed (1965) sugeriu que na meiose, os cromossomos holocêntricos possuem atividade cinética em regiões específicas como proposto por Bernardini (1959) em seu esquema de "cones de tração". Esta morfologia característica produz um comportamento diferenciado na meiose de organismos que possuem holocêntricos.

Nestes cromossomos, ao contrário dos monocêntricos, a primeira divisão meiótica pode ser equacional e a segunda reducional. Este tipo de comportamento meiótico, chamado meiose invertida (Pazi e Plitmann 1994) foi visto em vários gêneros em Cyperaceae como, *Carex* (WAHL, 1940), *Eleocharis* (STRANDHED, 1965; NIJALINGAPPA, 1973; HOSHINO, 1987), *Rhynchospora* (VANZELA *et al.*, 2000) e também nos gêneros *Cuscuta*, da família Cuscutaceae (PAZI; PLITMANN, 1994), além do gênero *Luzula*, da família Juncaceae (NORDENSKIÖLD 1951).

A orientação das cromátides e a restrição da atividade cinética a um ponto dos cromossomos, onde cada cromátide irmã possui uma região com esta atividade, dependem da terminalização dos quiasmas (NOKKALA, 1985; CAMACHO *et al.*, 1985). De acordo com a posição dos quiasmas, o alinhamento dos bivalentes holocêntricos pode ser paralelo ao eixo longo da placa equatorial, como observado em alguns invertebrados (HUGHES-SCHARADER 1948), ou ainda perpendicular ao eixo longo da placa equatorial, como normalmente ocorre nos cromossomos monocêntricos. Desse modo, se no momento da anáfase I as cromátides irmãs apresentarem orientação paralela, a separação ocorrerá com duas cromátides homólogas migrando juntas para cada lado da célula e quando isso ocorre há meiose invertida.

Durante o alinhamento dos bivalentes na meiose, uma estrutura característica dos cromossomos holocêntricos pode ser observada, este arranjo cromossômico é chamado de "estrutura em caixa", como demonstrado em *Rhynchospora cephalotes* (VANZELA *et al.*, 2000, Figura 8C). Uma outra característica citogenética comum em Cyperaceae é a perda da tétrade, onde, durante a formação do grão de pólen, três dos quatro

núcleos provenientes da meiose se degeneram e apenas um continua a se desenvolver. Após uma mitose polínica, este irá gerar os núcleos, vegetativo e generativo (STRANDHEDE, 1965; HARMS, 1968; NIJALINGAPPA, 1973; VANZELA *et al.*, 2000).

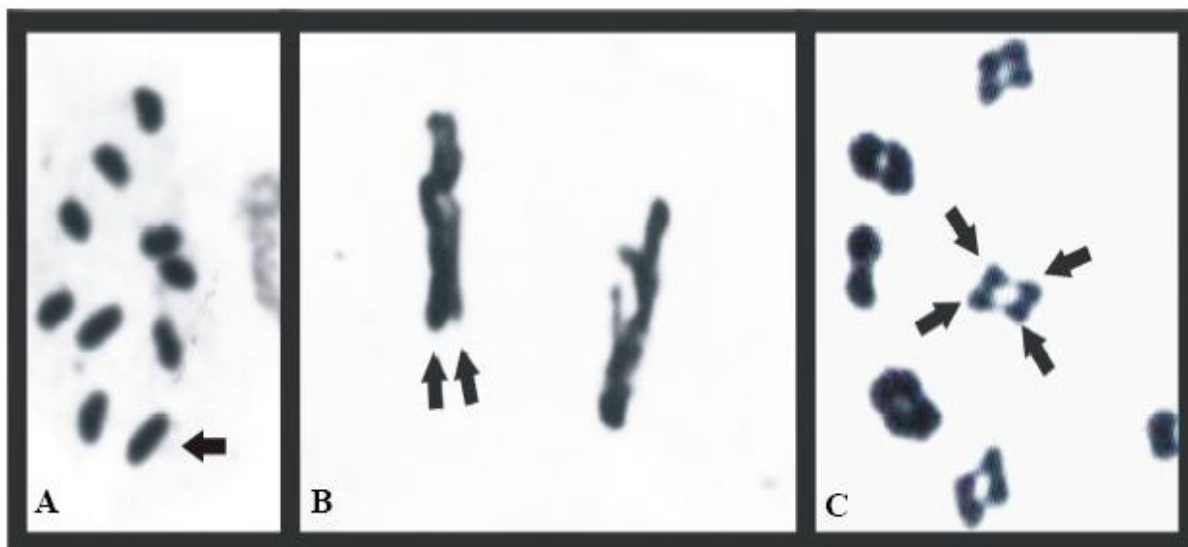


Figura 8 – A) Metáfase em *E. flavescens*. A seta mostra um cromossomo sem constrição primária. B) Anáfase mitótica em *Rynchospora tenuis*. As setas apontam as cromátides migrando paralelamente. C) Metáfase I em *R. cephalotes*. Observe os bivalentes formando estruturas em "caixa".

Informações citogenéticas adicionais, e que não têm sido usadas normalmente, são as referentes à estrutura dos núcleos interfásicos. Segundo Hoshino (1987), os núcleos interfásicos encontrados em algumas espécies de *Eleocharis* podem apresentar pequenos corpos fortemente corados. E estes podem se apresentar de maneira dispersa ou concentrados em regiões do núcleo, ou mostrar corpos condensados maiores em menor quantidade. Estes sinais são chamados de cromocentros, e estão relacionados ao padrão de condensação cromossômica. Todas as 16 espécies de *Rhynchospora* estudadas por Luceño *et al.* (1998) apresentaram apenas núcleos cromocentricos.

1.3 LOCALIZAÇÃO DE DNA REPETITIVOS

Existe uma grande variação tanto na quantidade quanto na disposição de bandas heterocromáticas em cromossomos de angiospermas, e esta variação pode ser vista até

mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie. Apesar das técnicas de bandamento mostrarem muita eficácia para a compreensão da organização cromossômica, tais estudos ainda são escassos em espécies vegetais com cromossomos holocêntricos (GUERRA, 2000).

Dentre as técnicas mais empregadas, o bandamento-C tem sido usado para localizar blocos de heterocromatina, enquanto que coloração com flurocromos DAPI (4'-6 diamidino - 2 fenilindole), CMA₃ (cromomicina A₃), e outras são úteis para determinar a composição de bases da heterocromatina. O DAPI liga-se preferencialmente em regiões cromossômicas ricas em adenina e timina (A-T), enquanto o CMA₃ liga-se preferencialmente em regiões ricas em citosina e guanina (C-G). O uso seqüencial destes flurocromos permite entender a composição e a dinâmica de muitas famílias de DNA altamente repetitivas nos genomas.

Trabalhos têm demonstrado que cromossomos holocêntricos podem exibir blocos definidos de heterocromatina em regiões terminais, bem como em regiões intersticiais (PANZERA *et al.*, 1992). Sheikh *et al.* (1995) estudaram algumas espécies de *Drosera* (Droseraceae) por bandamento e observaram que as bandas-C intersticiais foram encontradas em alguns cromossomos e outras bandas CMA₃/DAPI preferencialmente em regiões terminais.

Estudos com *Luzula faccida* realizados por Westerman e Collet (1984), demonstraram que os cromossomos desta espécie, quando em metáfase, apresentaram regiões de heterocromatina marcadas com banda-C, tanto em regiões terminais quanto intersticiais. Porém, quando estes cromossomos foram analisados em prófase, estas regiões de heterocromatina, apresentaram-se dispersas ao longo de cromossomos em pequenas porções. Isto poderia explicar distribuição e dispersão de bandas-C no núcleo desta espécie. Resultados de distribuição de bandas-C e de hibridação *in situ* com H-cRNA em *L. purpúrea* demonstram que padrão de distribuição de heterocromatina em cromossomos com cinetócoro difuso é similar a de cromossomos monocêntricos (JAMES; VENKETESWARAN 1979).

Muitos segmentos repetidos de DNA têm sido precisamente detectados e mapeados fisicamente pela técnica de hibridação *in situ*. No entanto, os sítios de DNA ribossomal são, sem

dúvida, os mais estudados por FISH em espécies vegetais e animais. Múltiplas áreas de DNAr 45S, distribuídas em metade dos cromossomos do complemento, foram descritas para alguns grupos como *Picea* (BROWN *et al.*, 1993), *Hordeum* (PEDERSEN; LINDE-LAURSEN, 1994), e em *Rhynchospora* (VANZELA *et al.*, 1998), sendo que este último gênero possui cromossomos holocêntricos.

Estudos realizados em *Eleocharis mamillata* var. *cyclocarpa* ($2n=16$), mostrou 12 sinais terminais com a sonda de DNAr 18S e dois sinais intersticiais com sonda de DNAr 5S, em *Carex pachgyna* e *C. ciliato-marginata*, a sonda de DNAr 5S mostrou sinais em regiões terminais e intersticiais, (FURUTA; HOSHINO, 1999). Estudo de citogenética molecular em *Rhynchospora*, uma outra Cyperaceae, mostrou um alto grau de variação no número de sítios de DNAr (18S-5.8S-26S), variando de 4 a 8 sítios em cariótipos com $2n = 10$, até 30 sítios em espécie com $2n = 50$ (VANZELA *et al.*, 1998). Estes autores em um outro estudo em *R. tenuis*, realizou hibridações *in situ* com sondas teloméricas (TTTAGGG), encontrando sinais apenas nas extremidades dos cromossomos de ambas as raças, sinais intersticiais não foram encontrados (VANZELA *et al.*, 2003). A escassez de informações citogenética em *Eleocharis* e nas Cyperaceae de um modo geral, tem dificultado a compreensão de como tais cariótipos se organizam e evoluem e torna evidente a necessidade de ampliar tais conhecimentos neste grupo de plantas com cromossomos pouco comuns.

1.4 OBEJTIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização cariotípica de 12 espécies do gênero *Eleocharis*, presente nos estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Mato Grosso, através de técnicas citogenéticas.

1.4.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar se o comportamento cromossômico das espécies do gênero *Eleocharis*, encontradas nas regiões estudadas, é típico de cromossomos holocêntricos;
- 2) Contar e determinar o número cromossômico para as populações estudadas de 12 espécies;
- 3) Verificar o nível de variação cariotípica dentro de *Eleocharis*;

4) Diferenciar os cariotípicos através da aplicação das técnicas de coloração (i) convencional com Giemsa e (ii) bandamento C-CMA₃/DAPI;

5) Localizar sítios de DNAr 45S, por FISH e verificar sua relação com os sítios de heterocromatina ricos em GC;

6) Estudar o processo de redução no número cromossômico em *E. subarticulata* através do seu comportamento meiótico, por FISH com sondas de DNAr 45S e de telômero;

7) Verificar se os mecanismos de evolução cariotípica por simploidia e agmatoploidia são tão importantes para *Eleocharis* quanto são para *Carex*, ou se estes cariótipos se organizam preferencialmente por poliploidia, como ocorre em *Rhynchospora*;

CAPÍTULO 2

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM REPRESENTANTES BRASILEIROS DO GÊNERO *ELEOCHARIS* R. Br. (CYPERACEAE JUSS.)*

*Este artigo será enviado para a publicação na revista Journal Plant Research.

ANÁLISE CITOGENÉTICA EM REPRESENTANTES BRASILEIROS DO GÊNERO *ELEOCHARIS* R. Br. (CYPERACEAE JUSS.)

Carlos RM Silva¹, M Gonzales³, José MD Torezan² and André LL Vanzela^{1,4}

¹Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná Brasil. ²Departamento de Biologia Animal e Vegetal, 86051-990, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná Brasil.

³Instituto Politécnico Nacional, CIDIR, Durango 34000, México. ⁴E-mail para correspondência: andrevanzela@uel.br

Resumo

Cariótipos de 24 populações de 12 espécies de *Eleocharis* (Cyperaceae) foram analisados. Todas as espécies mostraram cromossomos holocêntricos já que não foram observadas contrações primárias, apesar de quatro espécies apresentarem contrações nucleolares terminais. Os números cromossômicos variaram de $2n=6$ em *E. subarticulata* a $2n=54$ em *E. acutangula*. O número básico observado foi $x=5$, já que na maioria das espécies os números cromossômicos foram múltiplos de cinco. A poliploidia foi o evento mais freqüente e a agmatoploidia e a simpliploidia ocorreram apenas em duas espécies, *E. minima* e *E. subarticulata*, respectivamente. Bandamento C-CMA₃/DAPI foi realizado em seis espécies. Todas mostraram bandas CMA₃⁺ nas extremidades dos cromossomos de poucos pares. Apenas *E. sellowiana* apresentou bandas DAPI terminais em alguns cromossomos. FISH com a sonda de DNAr 45S foi feito em cinco espécies, e com exceção de duas com dez marcações terminais, as outras apresentaram quatro marcações. A maioria das espécies estudada pertence à seção *Eleocharis*, a qual contém a maior variação cariotípica. Em geral, os cariótipos foram diferenciados por simpliploidia, agmatoploidia e poliploidia, e algumas exibiram mais de um citótipo. Na seção *Eleogenus* as espécies estudadas foram poliplóides. Apenas uma espécie pertence à seção *Scirpidium*. Na seção *Limnochloa* as espécies analisadas exibiram cromossomos pequenos e numerosos, característico da seção. Estes resultados indicam que a poliploidia é o evento evolutivo mais importante na diferenciação dos cariótipos deste gênero.

Palavras-chave: Agmatoploidia. Cyperaceae. *Eleocharis*. Holocêntrico. Poliploidia. Simpliploidia.

Introdução

O gênero *Eleocharis* compreende cerca de 600 espécies, frequentemente encontradas em ambientes alagados (Svenson 1929; Gonzáles-Elizondo & Peterson 1997). *Eleocharis* se distingue dos demais grupos da família Cyperaceae por possuir colmo sem folhas, contendo uma espiguetta terminal simples (Brown 1810, *apud* Faria 1998). Espécies de *Eleocharis* são difíceis de identificar e de classificar devido à substancial redução floral e de características morfológicas. Apesar disto, *Eleocharis* apresenta-se morfológicamente bem delimitado dentro de Cyperaceae (Kukkonen 1990), o que o torna facilmente reconhecido no campo frente aos outros gêneros da família. O gênero sofreu muitas revisões e modificações nos últimos anos em sua classificação supraespecífica (Faria 1998). As classificações mais recentes são de Kukkonen (1990) e Gonzáles-Elizondo & Peterson (1997), porém, a mais amplamente aceita é a de Svenson, (1929, 1934, 1937, 1939).

A maioria dos conhecimentos citogenéticos em Cyperaceae vem de estudos com *Carex* e *Rhynchospora* (Daves 1956, Faulkner 1872, Luceno e Castroviejo 1991, Luceno *et al.* 1998, Vanzela *et al.* 2000). Estes e outros autores aceitam que as espécies de Cyperaceae compartilham características citogenéticas pouco comuns como: (i) cromossomos holocêntricos, (ii) meiose pós-reducional, (iii) ausência de tétrades, devido à degeneração de três dos quatro núcleos que formariam a tétrade e (iv) evolução cariotípica por agmatoploidia (fissão), simploidia (fusão) e poliploidia. A condição holocêntrica dos cromossomos em *Eleocharis* foi proposta por Håkansson (1954), após tratar amostras de *Eleocharis palustris* com raios-X e registrar o comportamento cinético normal dos fragmentos cromossômicos produzidos em ciclos celulares subsequentes. Greilhuber (1995) sugeriu que a ocorrência de cromossomos holocêntricos é uma sinapomorfia da família Cyperaceae, porém, uns poucos autores como Sanyal e Sharma (1972) propuseram que espécies de *Eleocharis* podem possuir cromossomos com centrômero localizado.

Na história citogenética do gênero *Eleocharis*, foram realizadas muitas contagens cromossômicas. A literatura mostra uma considerável variação numérica, $2n=10$ (Lewis *et al.* 1962) e

ca. 196 (Hoshino 1987), porém, todos associados ao possível número básico $x=5$. Variações cariótípicas intraespecíficas foram demonstradas em algumas espécies como: $2n=10$ e 20 em *E. geniculata*, originado por poliploidia (Sanyal e Sharma 1972, Nijalingappa 1973), e $2n=20$ e 21 em *E. atropurpurea* (Nijalingappa 1973) e $2n=15$ e 16 em *E. palustris* (Strandhede 1965), originados possivelmente por agmatoploidia/simploidia. Mais recentemente, Yano *et al.* (2004) reportou mixoploidia originada por fissão cromossômica na espécie japonesa *E. aciculares f. longiseta* ($2n=20$ e $2n=21$), além de realizar estudos moleculares com seqüências de ITS (*internal transcribed spacer*) relacionando-os com a taxonomia. Estes autores propuseram uma divisão citológica para o gênero, a qual separa as espécies com cariótipos com cromossomos pequenos e mais numerosos, de espécies com cromossomos grandes e menos numerosos.

Poucos estudos relatam os aspectos de segmentos de DNAs repetitivos em membros da família Cyperaceae. Greilhuber (1995) reportou a existência de inúmeros blocos heterocromáticos ricos em GC em *Carex* e, Vanzela e Guerra (2000), mostraram a ocorrência de diferentes tipos de eterocromatina (C-Giemsa⁺, CMA₃⁺/DAPI⁻, CMA₃⁺/DAPI⁺ e CMA₃⁻/DAPI⁺) em *Rhynchospora*. Além das distinções qualitativas nos segmentos heterocromáticos entre *Carex* e *Rhynchospora*, também foram evidenciadas diferenças quanto à localidade (blocos terminais e/ou intersticiais) e quanto à quantidade de blocos. Em *Drosera* (Droseraceae) bandas ricas tanto em AT quanto em CG foram observadas em regiões cromossômicas terminais (Sheikh e Kondo 1995).

Estudos com FISH utilizando sondas de DNAr 45S em Cyperaceae foram realizados em *Rhynchospora* por Vanzela *et al.* (1998). Estes autores mostraram uma grande variação no número de sítios encontrados para as oito espécies analisadas, porém, estáveis quanto à localização, já que todos os sítios foram encontrados nas regiões terminais dos cromossomos. Estudos em *Eleocharis mamillata var. cyclocarpa* ($2n=16$) mostraram sítios intersticiais de DNAr 5S em apenas dois cromossomos e sítios terminais de DNAr 18S em doze cromossomos dos 16 cromossomos do complemento. Para as espécies de *Carex pachygyna* e *Carex ciliato-marginata*, ambas com $2n=12$, sítios de DNAr 5S

ocorreram em regiões terminais e intersticiais e sítios de DNAr 18S nas regiões terminais (Furuta e Hoshino 1999).

Uma outra característica citogenética estudada neste gênero é o aspecto do núcleo interfásico os quais apresentam blocos pequenos ou grandes fortemente corados chamados cromocentros em outras espécies o núcleo mostra pequenos pontos corados e dispersos por todo o núcleo, estes sinais estão relacionados com o padrão de condensação cromossômica (Hoshino, 1987).

Neste estudo foram analisados os cariótipos de 24 populações de 12 diferentes espécies naturais da América do Sul, com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a citogenética de *Eleocharis*. Para tal, foram comparadas características citogenéticas, tais como a estrutura do núcleo interfásico, o tamanho e os números dos cromossomos, a ocorrência e a distribuição de segmentos heterocromáticos ricos em AT e CG e o número e a posição dos sítios de DNAr 45S. A discussão foi conduzida para esclarecer aspectos sobre a evolução e a diferenciação cariotípica neste grupo, bem como a relação destes caracteres com a classificação taxonômica do grupo.

Materiais e Métodos

Doze espécies de *Eleocharis* foram coletadas em nove locais diferentes das regiões, sudeste e sul do Brasil, sendo que em alguns locais foram coletadas mais de uma espécie. Os exemplares foram cultivados no viveiro do Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, CCB, UEL e as exsicatas depositadas no herbário FUEL (Tabela 1). A contagem cromossômica foi realizada em 20 células por espécie, e o tamanho dos cromossomos medidos em dez metáfases com a mesma condensação.

Para a análise citogenética foram utilizadas pontas de raízes pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína 2mM por 24h e posteriormente fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1, v:v) por 12h e estocadas a -20°C, até o momento do uso. Para a análise convencional, lâminas foram preparadas com raízes digeridas em celulase 4% e pectinase 40% a 37°C por 3h e hidrolisadas em HCl 1M a 60°C por 10 minutos. As raízes foram dissecadas e esmagadas em uma gota de ácido acético

45%. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido, e o material corado com Giemsa 2%. Para testar a migração paralela dos cromossomos holocêntricos em anáfase, lâminas foram preparadas com meristemas fixados sem um prévio tratamento com agente antimitótico. Células foram fotografadas com filme Kodak Imagelink HQ 25 ISO.

Para o bandamento cromossômico, as raízes foram pré-tratadas e fixadas como descrito anteriormente e as lâminas preparadas após uma digestão enzimática dos meristemas em celulase 4% e pectinase 40% a 37°C por 3h, e sem a hidrólise ácida. O bandamento seguiu o protocolo de Schwarzscher *et al.* (1980), com modificações. Após o tratamento com ácido acético 45%, hidróxido de bário 5% e 2xSSC, os materiais foram corados sequencialmente com CMA₃ (0,5 (ig/mL por 1,5h) e DAPI (2 (ig/mL por 30 min). As lâminas foram montadas com uma mistura de glicerol/tampão McIlvaine 1:1, pH 7,0 com 2,5 mM MgCl₂. Após três dias, foram observadas e fotografadas com filme Kodak T-Max 100 ISO.

Na hibridação *in situ* com fluorocromos foi utilizada a sonda pTa71 isolada de *Triticum aestivum* a qual contém o segmento completo de DNAr 45S (Gerlach e Bedbrook 1979). A sonda foi marcada com biotina-14-dATP por *nick translation*. As lâminas foram preparadas como descrito para o bandamento, tratadas com RNase (100(g/ml), pós-fixadas em paraformaldeído 4% (v/v) e desidratadas em álcool 70% e 100%. Antes da hibridação 200ng de sonda marcada foram misturados a uma solução contendo formamida (50%), polietileno glicol (10%), SDS (0,3%), DNA de timo de bezerro (0,3%) e 2xSSC, a um volume final de 30 µL/lâmina. A mistura de hibridação foi desnaturada a 70°C por 10 minutos e imediatamente colocada no gelo por pelo menos 10 minutos. Após a mistura de hibridação ser colocada sobre o material, a desnaturação dos cromossomos foi feita a 90 °C por 10 min., 50 °C for 10 min., 38 °C for 10 min, usando um termociclador. A hibridação foi feita a 37 °C *overnight* em câmara úmida. As lavagens pós- hibridação foram feitas com 2 banhos em 6xSSC 10 min cada, e um banho 4xSSC/ 0,2% Tween 20, todos a temperatura ambiente. As sondas foram detectadas com avidina-FITC, lavadas em 4xSSC/0.2% Tween 20. Os cromossomos foram contra-corados com iodeto de propídeo (2.5(µg/mL⁻¹). As lâminas foram montadas com uma solução

composta por Antifade (50%) e glicerol/tampão McIlvaine pH 7.0 (50%). Fotografias foram tiradas com o filme Kodak Proimage color 100 ISO.

Resultados e Discussão

Análise citogenética e mecanismos de diferenciação cariotípica

Neste estudo foram analisados os cariótipos de 24 populações de 12 espécies de *Eleocharis* ocorrentes nas regiões sudeste e sul do Brasil. Dez espécies tiveram seus números cromossômicos contados pela primeira vez, e para duas espécies os números foram confirmados (Tabela 1). Neste trabalho os números cromossômicos variaram de $2n=6$ em *Eleocharis subarticulata* (Figura 1A) a cerca de 50-54 em *E. acutangula* e *E. brasilienses* com $2n \approx ca.50$ (Figuras 1L e 1M). Números intermediários foram encontrados em *E. maculosa*, *E. flavensces* e *E. radicans* ($2n=10$, Figuras 1B, 1C e 1D), *E. minima* ($2n=12$, Figura 1E), *E. sellowiana* e *E. geniculata* ($2n=20$, Figuras 1F e 1G) e *E. elegans* ($2n=40$, Figura 1K). Duas espécies apresentaram dois citótipos diferentes, *E. retroflexa* com $2n = 10$ e $2n = 30$ (Figuras 1H e 1I) e *E. montana* com $2n=20$ e 40 (Figura 1J). Estudos citogenéticos em *Eleocharis* datam de antes de 1924, quando Piech descreveu o número cromossômico de *E. paustris* (Nijalingappa 1973). Alguns trabalhos reportam uma considerável variação no número e no tamanho dos cromossomos deste gênero, $2n = 10$ (Lewis *et al.* 1962) e de $2n=ca.196$ (Hoshino 1987). Variações intraespecíficas têm sido apontadas em algumas espécies de *E. geniculata*, com $2n = 10$ e 20 (Sanyal e Sharma 1972, Nijalingappa 1973), *E. atropurpurea* com $2n = 20$ e 21 (Nijalingappa 1973), e *E. palustris* com $2n = 15$ e 16 (Strandhede 1965). A tabela 1 traz todos os números cromossômicos descritos para *Eleocharis* até o momento.

A maioria dos números encontrados neste trabalho é múltipla de cinco (Tabela 1), o qual foi sugerido como número básico para *Rhynchospora* (Luceno *et al.* 1998). No entanto, estes autores também encontraram $x=6$ e $x=9$ neste gênero, provavelmente derivados por poliploidia e disploidia (Vanzela *et al.* 2000). Para *Fimbristylis*, também foi proposto o mesmo número básico $x=5$, (Bir *et al.* 1992), e semelhantemente a *Rhynchospora*, outros números básicos foram encontrados, como $x = 11$

(Nijalingappa 1977). Apesar da ocorrência de variações em algumas espécies de Cyperaceae o número básico $x = 5$ é o mais comum, e está de acordo com o proposto por Løve *et al.* (1957). Com exceção de *E. subarticulata*, cujo cariótipo com $2n=6$ que deve provavelmente ter sido originado por simploidia, e *E. mínima*, com $2n=12$ e *E. acutangula* $2n = 54$ provavelmente originados por agmatoploidia, os demais são poliplóides.

Análises cariotípicas em Cyperaceae, revelaram que a tendência para a manutenção dos tamanhos cromossômicos entre espécies diferentes com o mesmo número cromossômico não se aplica a *Eleocharis*. Isto também foi observado em *Rhynchospora* (Luceno *et al.* 1998), onde *R. pubera* com $2n= 10$ possui cromossomos três vezes maiores do que os *R. ciliata* também com $2n=10$. Tais variações foram evidenciadas também entre *E. maculosa*, *E. flavescens* (Tabela 1, Figuras 1B, 1C). *Eleocharis retroflexa* ($2n = 30$, Figura 1I) destacou-se das demais por apresentar um par cromossômico com tamanho muito maior que os demais cromossomos do complemento, do mesmo modo que *E. minima* apresentou um par muito menor em relação aos demais cromossomos do complemento (Figura 1E). De outro modo, *E. brasilienses* e *E. acutangula* apresentaram o maior número cromossômico, porém, com os menores tamanhos (Figuras 1L e 1M) . Nas demais espécies houve uma redução gradual no tamanho dos cromossomos dentro de cada complemento.

Hoshino (1987) encontrou três variações cariotípicas em relação ao tamanho dos cromossomos: (i) a variação bimodal, com dois grupos de cromossomos de tamanho diferenciado, (ii) a variação gradual, onde o tamanho dos cromossomos diminui gradualmente, e (iii) o cariótipo homogêneo onde todos os cromossomos possuem tamanhos próximos, porém todos muito pequenos. Yano *et al.* (2004) em seu estudo com espécies japonesas de *Eleocharis* sugeriu que este gênero pode ser dividido em dois grandes grupos, baseado em seus cariótipos. O primeiro incluindo cariótipos com cromossomos muito pequenos com menos de $1,1\mu\text{m}$ de comprimento, e o segundo incluindo cariótipos com cromossomos com tamanhos entre $1,4$ a $4,3\mu\text{m}$. Quando estes dados cariotípicos são associados com dados morfológicos, as espécies que possuem cromossomos com tamanhos próximos e muito pequenos se encontram na seção *Limnochloa*, e que as espécies com cariótipos que possuem variações

tipo bimodal e gradual se encaixam na seção *Eleocharis* e seção *Eleogenus*. Os dados de medidas cromossômicas realizadas neste trabalho corroboram as análises realizadas por Hoshino (1987) e Yano *et al.* (2004) já que foi observado que os cariótipos com os menores cromossomos pertencem a *E. brasilienses* e *E. acutangula*, ambas pertencentes à seção *Limnochloa* (Tabela 1, Figuras 1L e 1M) e os demais cariótipos pertencentes às espécies da seção *Eleocharis* e seção *Eleogenus*. E *E. radicans* foi a única espécie coletada pertencente a Subgênero *Scirpidium*, Seção *Scirpidium*.

A poliploidia foi melhor registrada nas duas espécies que apresentaram citótipos. Em *E. montana* ($2n=20$ e 40), as populações com $2n=20$ mostraram um comprimento total próximo à metade do comprimento total das populações com $2n=40$. Interessantemente diferenças morfológicas foram encontradas apenas entre populações com $2n=40$. Sendo assim, nossos dados sugerem que o processo de poliploidização pode ter sido um evento antigo, em um tempo suficiente para que populações isoladas apresentem um nível maior de diferenciação. Um caso semelhante foi encontrado em *E. retroflexa* ($2n = 10$ e 30), onde a população com $2n=10$ mostrou um comprimento total de cerca de $1/3$ do comprimento total observado na população com $2n = 30$. Porém ambas as populações não mostraram diferenças morfológicas capazes de diferenciá-las, sugerindo um processo de poliploidia recente, apesar da diferença marcante encontrada no primeiro par cromossômico, que na população com $2n=30$ foi extremamente maior que os demais cromossomos do complemento (veja Figura 1H e Este resultado sugere que houve um aumento no número cromossômico que resultou em um aumento proporcional no tamanho total do cariótipo (Tabela 1). Um caso ilustrativo onde poliploidia pode ter sido marcante no processo de especiação foi encontrado no complexo *Rhynchospora nervosa* ($2n=30$) e *Rhynchospora ciliata* ($2n=10$), duas espécies que se acreditava ser de um único grupo. *R. ciliata* era considerada uma subespécie de *R. nervosa* e, com base em características morfológicas, ecológicas e principalmente citológicas estas foram identificadas como espécies distintas (Luceño *et al.* 1998).

Das espécies analisadas, *Eleocharis sellowianae* *E. flavescens* são muito similares e de difícil diferenciação. Pois ambas são perenes, cespitosas e estoloníferas, com estolões ocráceos com escamas lanceoladas e base púrpura, espiguetas com formas diferentes, porém ambas com flores espiraladas,

glumas basais estéreis lanceoladas a oblongas, ápice arredondado, nervuras centrais esverdeadas, podendo haver variação na coloração das nervuras. Apesar dos aquênios apresentarem formas e coloração distintas, ambos são 2-convexos, obovóides, com superfície aparentemente lisa e base do estilete cônica, às vezes com ápice alongado. No entanto, a análise cariotípica permitiu aumentar o número de caracteres que as distingue, pois *E. sellowiana* possui $2n = 20$, e *E. flavescens* possui $2n = 10$, porém, ambas com cromossomos que variam gradualmente em tamanho.

Nenhuma espécie estudada apresentou cromossomos com constrição primária, além disso, a análise do comportamento anafásico em *E. sellowiana* (dados não apresentados) mostrou que os cromossomos migram paralelos ao eixo da placa equatorial, concordando com vários trabalhos que sugerem a ocorrência de cromossomos holocêntricos em *Eleocharis*, (Strandhede 1965, Harms 1968, Nijalingappa 1973, Hoshino 1987). No entanto, constrições nucleolares terminais foram encontradas em *E. radicans* ($2n = 10$), *E. retroflexa* ($2n = 10$) e *E. acutangula* ($2n = 54$) e em uma população de *E. sellowiana* ($2n = 20$) (Figuras 1D, 1F, 1H e 1M). Este tipo de constrição também foi visto por Hoshino *et al.* (1987) em *Eleocharis* e por Vanzela *et al.* (1996) e Luceño *et al.* (1998) em *Rhynchospora*. Os dados encontrados neste estudo reforçam a idéia de que a presença de cromossomos holocêntricos seria uma característica sinapomórfica para Cyperaceae (Greilhuber 1995).

Ainda vale ressaltar que esta não é a única característica citogenética constante em *Eleocharis*, como ocorrem em muitos organismos com cromossomos holocêntricos. Para a maioria das espécies estudadas, os núcleos interfásicos foram difusos (Figura 1), sendo que para poucas espécies, como *E. acutangula*, vários cromocentros puderam ser visualizados no núcleo interfásico, como descrito anteriormente por Hoshino (1987).

Tabela 1 – Contagens cromossômicas previamente publicadas no gênero *Eleocharis*. * Indica as espécies que tiveram seus números cromossômicos contados pela primeira vez e as medidas cromossômicas com o local de cada população.

Classificação	2n	Tamanho	Referências	Local de Coleta	Exsicata
Subgênero <i>Eleocharis</i> S. Gonzáles & P.M. Peterson (1997)					
Seção <i>Parvulae</i> T. V. Egor. (1976)					
<i>E. intermetia</i> Schult	10	-	Strandhede 1965		
Seção <i>Eleocharis</i> S. Gonzáles & P.M. Peterson (1997)					
<i>E. subarticulata</i> (Nees) Boeckl.*	6	3,0-1,5µm		Ponta Grossa, PR.	35.411
<i>E. retroflexa</i> (Poir.) Urban.*	10 30	2,9-2,0µm 4,0-1,3µm		Florianópolis, SC. Sapopema, PR.	35.408 35.410
<i>E. minima</i> Kunth.*	12	2,7-0,9µm		Sapopema, PR.	35.403
<i>E. palustris</i> (L.) R. & S.	16	-	Strandhede 1965 Strandhede 1965		
<i>E. valleculosa</i> Ohwi.	16	-	Hoshino <i>et al.</i> 2000		
<i>E. smallii</i> Britt.	16, 36	-	Strandhede 1965		
<i>E. calva</i> Torr.	18	-			
<i>E. compressa</i> Sulliv.	18	-			
<i>E. perlonga</i> sinônimo <i>E. macrostachya</i> Britton in Small	18, 19, 38	-	Strandhede 1965		
<i>E. erythropoda</i> Steud.	18, 19, 20	-	Strandhede 1965		
<i>E. multicaulis</i> (Sm.) Sm.	20	-	Davies 1956		
<i>E. wichurae</i> Böckl.	20	1,7-2,7µm	Hoshino 1987		
<i>E. tetraquetra</i> Ness ex Wight.	20	1,6-2,7µm	Hoshino 1987		
<i>E. margaritacea</i> (Hult.) Miyabe & Kudo.	20	-	Yano <i>et al.</i> 2004		
<i>E. halophila</i> (Fernald & Brackett).	38, 37	-	Strandhede 1965		
<i>E. elliptica</i> Kunth.	38	-			
<i>E. fallax</i> Weatherby.	42	-	Strandhede 1965		
<i>E. kamtschatica</i> (C. A. Mey) Komarov.	44 42, 46	-	Hoshino <i>et al.</i> 2000 Strandhede 1965		
<i>E. ambigens</i> Kuekenenthal.	44, 45, 46	-	Strandhede 1965		
<i>E. uniglumis</i> (Link) Schultes.	46	-	Davies 1956		
<i>E. montana</i> (Kunth) Roem. & Schult.*	20 40	2,3-1,3µm 2,2-1,1µm		Pantanal, MS. Bela Vista do P., PR. Rolândia, PR. Assaí, PR. Sapopema, PR.	36.079 36.081 35.422 36.073 36.064
<i>E. elegans</i> (HBK) R. & S.*	40	2,2-1,0µm		Assaí, PR.	36.074
Seção <i>Eleogenus</i> (Nees) Benth. & Hook (1883)					
<i>E. obrusa</i> (Willd.)	10, 9	-	Strandhede 1965		
<i>E. engelmannii</i> Steud.	10	-			

<i>E. flavescens</i> (Poir.) Urban*	10	2,0-1,3µm		Rolândia, Ponta Grossa, PR.	35.424
<i>E. maculosa</i> (Vahl) Roem. & Schult.*	10	2,4-1,6µm		Florianópolis, SC. Tibagi, PR.	35.406 35.434
<i>E. quinqueflora</i> (F.X. Hartm.) Schwarz.	10	-	Davies 1956		
<i>E. ovata</i> (Roth) Roem. & Schult.	10	-	Strandhede 1965		
<i>E. mamillata</i> var. <i>cyclocarpa</i> (Lindb) f.	16	-	Strandhede 1965		
<i>E. mamillata</i> ssp. <i>Mamillata</i>	15	-	Strandhede 1965		
<i>E. geniculata</i> (L.) Roem & Schult.	20	3,3-4,5µm	Sanyal and Sharma 1972 Nijalingappa 1973	Ponta Grossa, PR.	36.084
<i>E. sellowiana</i> Kunth.*	20	2,6-1,4µm		Ibitinga, SP Rolândia, PR. Bela Vista do P., PR.	35.429 35.426 36.080
<i>E. acicularis</i> (L.) R. & S.	20	-	Hoshino 1987		
<i>E. congesta</i> D. Don.	20	2,1-3,1µm	Nijalingappa 1973		
<i>E. congesta</i> var. <i>thermalis</i>	20	1,5-2,5µm	Hoshino 1987		
<i>E. atropurpurea</i> (Retz.) Presl.	20, 21	2,2-3,5µm	Nijalingappa 1973		
<i>E. elliptica</i> Kunth.	38	-			
<i>E. fernaldii</i> (Svenson) A. Love.	80	-			
Subgênero <i>Limnochloa</i> (P. Beauv. ex Lestib.) Torr. (1836)					
Seção <i>Limnochloa</i> (P. Beauv. Ex Lestib.) Benth. (1836).					
<i>E. brasiliensis</i> Chapman.*	ca. 50	-		Campinas, SP.	35.406
<i>E. acutangula</i> (Roxb.) Schult. sinonimo <i>E. fistulosa</i> Link ex Spreng.	54	0,3-0,2µm	Hoshino 1987		
<i>E. ochrostachys</i> (Steud.).	74	-	Yano <i>et al.</i> 2004		
<i>E. kurogawai</i> Ohwi.	c.a.196	-	Hoshino 1987		
<i>E. dulci</i> (Burm. f.) Trin. ex Henschel.	ca.196	-	Yano <i>et al.</i> 2004		
Subgênero <i>Scirpidium</i> (Nees) Kukk. (1990).					
Seção <i>Scirpidium</i> (Nees) Benth. & Hook. f. (1883).					
<i>E. radicans</i> (Poir.) Kunth, Enum.*	10	-		Campinas, SP.	35.403
<i>E. acicularis</i> (L.) R. & S.	20	1,5-2,5µm	Hoshino 1987		
Subgênero <i>Zinserlingia</i> T. Egor. (1981).					
Seção <i>Baeothryon</i> (Gray) S. Gonzáles & P. M. Peterson (1997)					
<i>E. parvula</i> (Roem. & Schult.) Link ex Bluff.	10	-	Yano <i>et al.</i> 2004		

Localização de DNA repetitivos

O bandamento C-CMA3/DAPI mostrou bandas preferencialmente nas regiões terminais dos cromossomos. Em *E. retroflexa*, *E. sellowiana*, *E. geniculata*, *E. elegans* e *E. Montana* (Figuras 2B, 2C, 2D, 2E e 2F) foram visualizadas bandas CMA₃⁺ tênues em apenas um par cromossômico, independente do número cromossômico. Um número maior de blocos foi observado em *E. flavescens* a qual mostrou seis cromossomos marcados (Figura 2A), e em *E. acutangula*, a qual exibiu vários cromossomos marcados. No entanto, devido ao tamanho pequenos dos cromossomos de *E. acutangula* não foi possível determinar o número exato de bandas (Figura 2G). Bandas DAPI foram encontradas apenas em *E. sellowiana*, a qual exibiu sete cromossomos marcados nas regiões terminais (Figura 2H). O padrão CMA₃⁺/DAPI⁻ foi o mais encontrado para as espécies deste gênero. Em *Rhynchospora*, três padrões de coloração CMA₃/DAPI foram identificadas, sendo eles CMA₃⁺/DAPI⁻, CMA₃⁺/DAPI⁺ e CMA₃⁻/DAPI⁺. Estes variaram em tamanho, posição e localização, indicando que neste gênero existe uma variação heterocromática muito maior do que no gênero *Eleocharis* (Vanzela e Guerra 2000). Greilhuber (1995) reportou a ocorrência de diversas bandas terminais ricas em CG em *Carex*, provavelmente relacionadas com NORs, o que também foi sugerido em *Rynchospora*, (Vanzela e Guerra 2000). Para *Eleocharis* o número de regiões heterocromaticas ricas em CG foi menor em relação ao número de regiões hibridadas com a sonda DNAr 45S, porém, todas estas marcações foram encontradas em posições terminais, indicando que apenas algumas NORs são ricas em CG. Neste ponto é possível propor a ocorrência de pelo menos três famílias de DNA repetitivos em *Eleocharis*, bandas C-CMA₃⁺, associadas à NOR, bandas C-CMA₃⁺, não associadas a NOR e bandas C- DAPI⁺.

Os resultados da hibridação *in situ* com sonda DNAr 45S, mostraram apenas sítios terminais de hibridação. Das cinco espécies estudadas, *E. flavescens* (2n=10) e *E. sellowiana* (2n=20) mostraram dez sinais terminais, e em *E. maculosa* (2n=10), *E. montana* (2n=40) e *E. geniculata* (2n=20) (Figura 3), independente dos seus números cromossômicos e suas posições taxonômicas, todas apresentaram dois pares cromossômicos com sítios terminais. Os dados obtidos sugerem que os segmentos de DNAr

45S de *Eleocharis* hibridizados são homólogos ao DNAr 45S (1.8S-5.8S-28S) isolado de *Triticum aestivum*. O mesmo foi visto em *Rhynchospora*, onde a distribuição deste sítio coincidiu quanto a posição terminal. No entanto, espécies de *Rhynchospora* mostraram uma maior variação no número de sítios entre as espécies (Vanzela *et al.* 1998). Furuta e Hoshino (1999) realizaram hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 18S em *E. mamillata* var. *cyclocarpa* ($2n=16$) e encontraram doze sítios terminais com dois cromossomos pequenos, portando sítios em ambas as extremidades, além de sítios DNAr 5S intersticiais em um par cromossômico. Estes autores também encontraram sítios terminais em *Carex pachyina* ($2n=12$) e *Carex ciliatomarginata* ($2n=12$). No entanto, é possível que *Eleocharis* também possua outras espécies com múltiplos sítios de DNAr 45S, o que pode ser encontrado se analisarmos um número maior de espécies.

Devido à ampla diversidade de grupos que têm sido reconhecidos em *Eleocharis* e a descoberta de novas espécies na Flora Mesoamericana, ficou evidente que a classificação supraespecífica do gênero feita por Svenson necessita de uma reestruturação (González-Elizondo e Peterson 1997). Os dados citológicos mostrados neste trabalho concordam com Yano *et al.* (2004), os quais separam as espécies da seção *Limnochloa* das da seção *Eleocharis* e seção *Eleogenus*, por possuírem cromossomos numerosos e extremamente pequenos, característica que parece definir a seção. Assim sendo, a análise citogenética pode ser utilizada neste caso como um caráter micromorfológico muito útil na taxonomia.

CAPES e Fundação Araucária/ProPPG-UEL pelo suporte financiamento ao projeto.

Referências Bibliográficas

- Bir SS, Cheema P, Sidhu MK (1992) Chromosomal Analysis of *Fimbristylis* Vahl in Punjab, North West India. Proc. Indian Natn. Sci Acad. B58 1:63-70.
- Davies EW (1956) Some new chromosome numbers in the Cyperaceae. Watsonia 3:242-243.
- Faulkner JS (1972) Chromosome studies on *Carex* section *Acutae* in north-west Europe. Bot Jour Linn Soc 65:271-301.

- Faria AD O gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo. Mestrado em Biologia Vegetal. Unicamp, 1998, 150 pg.
- Furuta K, Hoshino T (1999) Localization of the 18S and 5S rDNA on the chromosomes com non-localized centromere in Cyperaceae. XVI International Botanical Congress. Abstract Number: 4331 Poster No.=1829.
- Gerlach WL, Bedbrook JR (1979) Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. Nucleic. Acid. Res. 7:1869-1885.
- Gonzales-Elizondo MS, Peterson PM (1997) A classification of the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyepraceae). Taxon 46:433-449.
- Greilhuber J (1995) Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In P.J. Randall, P.J. Cribb, D.F. Cutler and C.J. Humphries (eds.). Monocotyledons: systematics and evolution. Royal Botanic Gardens, Kew 379-414.
- Håkansson A (1954) Meiosis and pollen mitosis in X-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. *Hereditas* 40: 325-345.
- Harms LJ (1968) Cytotaxonomic Studies in *Eleocharis* Subser. Palustres: Central united States Taxa. Amer. J. Bot. 55 (8):966-974.
- Hoshino T (1987) Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. Bull. Okayama Uni. Sic. 22:305-312.
- Kukkonen I (1990) On the genus *Eleocharis* (Cyperaceae) in Flora Iranica area, with revised infrageneric classification and nomeclature. Ann. Bot. Fennici 27:109-117.
- Lewis WH, Stripling HL, Ross RG (1962) Chromosome numbers for some angiosperms of the southern United States and Mexico. *Rhodora* 758: 147-161.
- Luceno M, Castroviejo S (1991) Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae) Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Pl. Syst. Evol.* 177:149-159.

- Luceno M, Vanzela ALL, Guerra M (1998) Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can. J. Bot.* 76:440-449.
- Löve A, Löve D, Raymond M (1957) Cytotaxonomy of *Carex* section *Cappilares*. *Canadian Journal of Botany* 35: 715-761.
- Nijalingappa BHM (1973) Cytological studies in *Eleocharis*. *Caryologia* 26:513-520.
- Nijalingappa BHM (1977) Autotetraploidy in *Fimbristylis falcate* (Vahl) Kunth (Cyperaceae). *Proc. Indian Acad. Sci.*, Vol, 85B 1:21-24.
- Sanyal B, Sharma AK (1972) Cytological studies in Indian Cyperaceae. I Tribe Scirpeae. *Cytologia* 37:13-32.
- Schwarzacher TP, Ambros P, Schweizer D (1980) Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl Syst Evol* 134:293-297.
- Sheikh SA, Kondo K, (1995) Differential staining with orcein, giemsa CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Am. J. Bot.* 82:1278-1286.
- Svenson HK (1929) Contributions from the gray herbarium of Havard University. LXXXVI. Monographic studies in the genus *Eleocharis*. *Rhodora*. 31: 121-245.
- Svenson HK (1932) Monographic studies in the genus *Eleocharis* II. *Rhodora*. 34: 193-230.
- Svenson HK (1934) Monographic studies in the genus *Eleocharis* III. *Rhodora*. 36: 377-408.
- Svenson HK (1937) Monographic studies in the genus *Eleocharis* IV. *Rhodora*. 39: 219-279.
- Svenson HK (1939) Monographic studies in the genus *Eleocharis* V. *Rhodora*. 41: 1-110.
- Strandhede SO (1965) Chromosome studies in *Eleocharis suber. Palustris*. I. Meiosis in some forms with 15 chromosomes. *Hereditas* 53: 43-47.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceno M (1996) *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes ($n = 2$). *Cytobios* 88: 219-228.

- Vanzela ALL, Cuadrado A, Jouve N, Luceno M, Guerra M (1998) Multiple locations of the rDNA in species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chrom Res* 6:345-349.
- Vanzela ALL, Guerra M (2000) Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 23: 453-456.
- Yano O, Katsuyama T, Tsubota H, Hoshino T (2004) Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. *J. Plant Res.* 117:409-419.

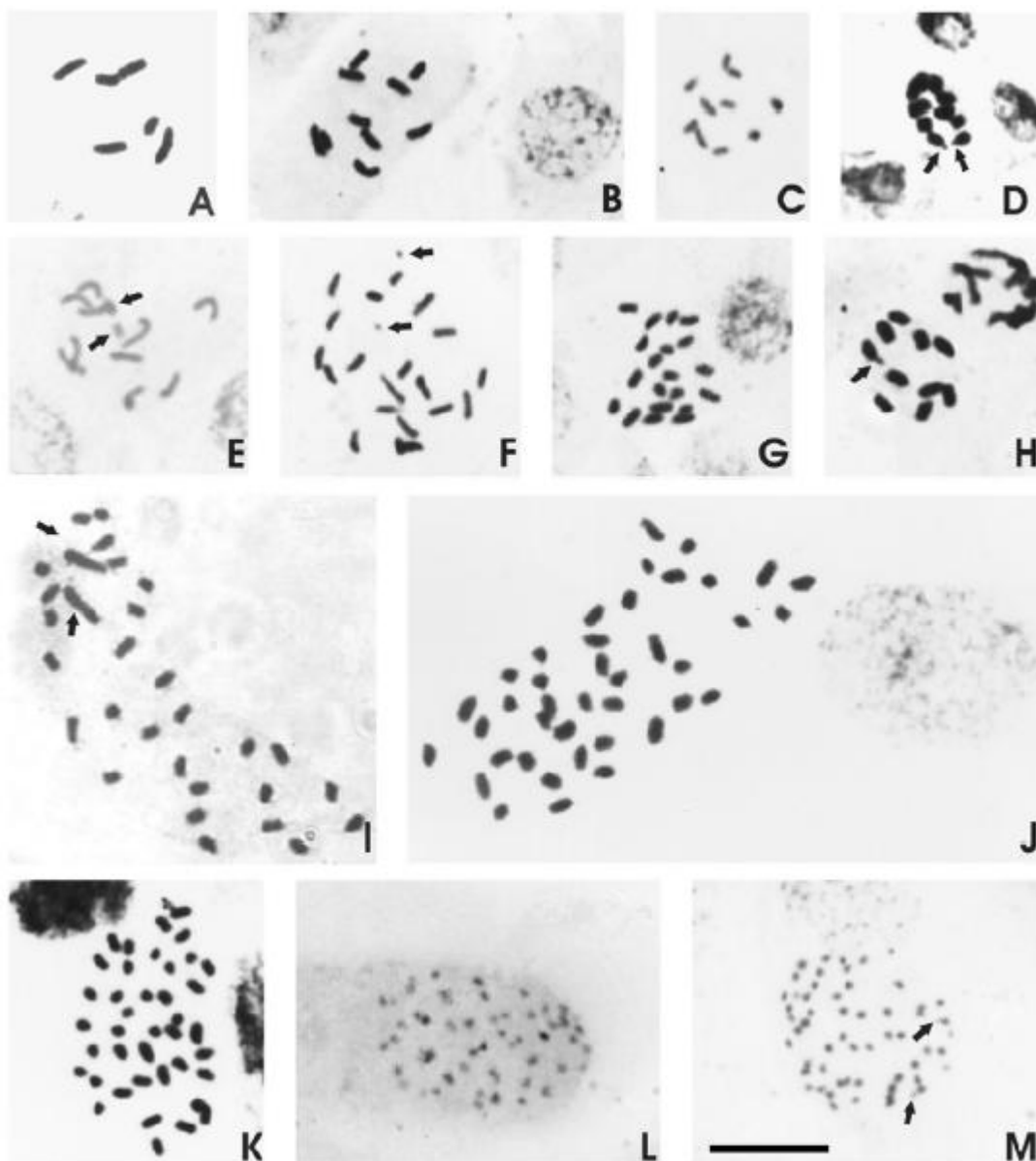


Figura 1. Fotos de metáfases de *Eleocharis* estudadas. A) *E. subarticulata* (2n=6). B) *E. maculosa*. C) *E. flavescens* (2n=10). D) *E. radicans* (2n=10). As setas apontam as constrições nucleolares terminais. E) *E. minima* (2n=12). As setas apontam os menores cromossomos. F) *E. sellowiana* (2n=20). As setas apontam os satélites. G) *E. geniculata* (2n=20). H) *E. retroflexa* (2n=10). A seta aponta uma constrição nucleolar terminal. I) *E. retroflexa* (2n=30). As setas apontam os maiores cromossomos. J) *E. montana* (2n=40). K) *E. elegans*. L) *E. brasiliensis* (2n=ca.50). M) *E. acutangula* (2n=54). As setas apontam as constrições nucleolares terminais. A barra = 13,5 μ m.

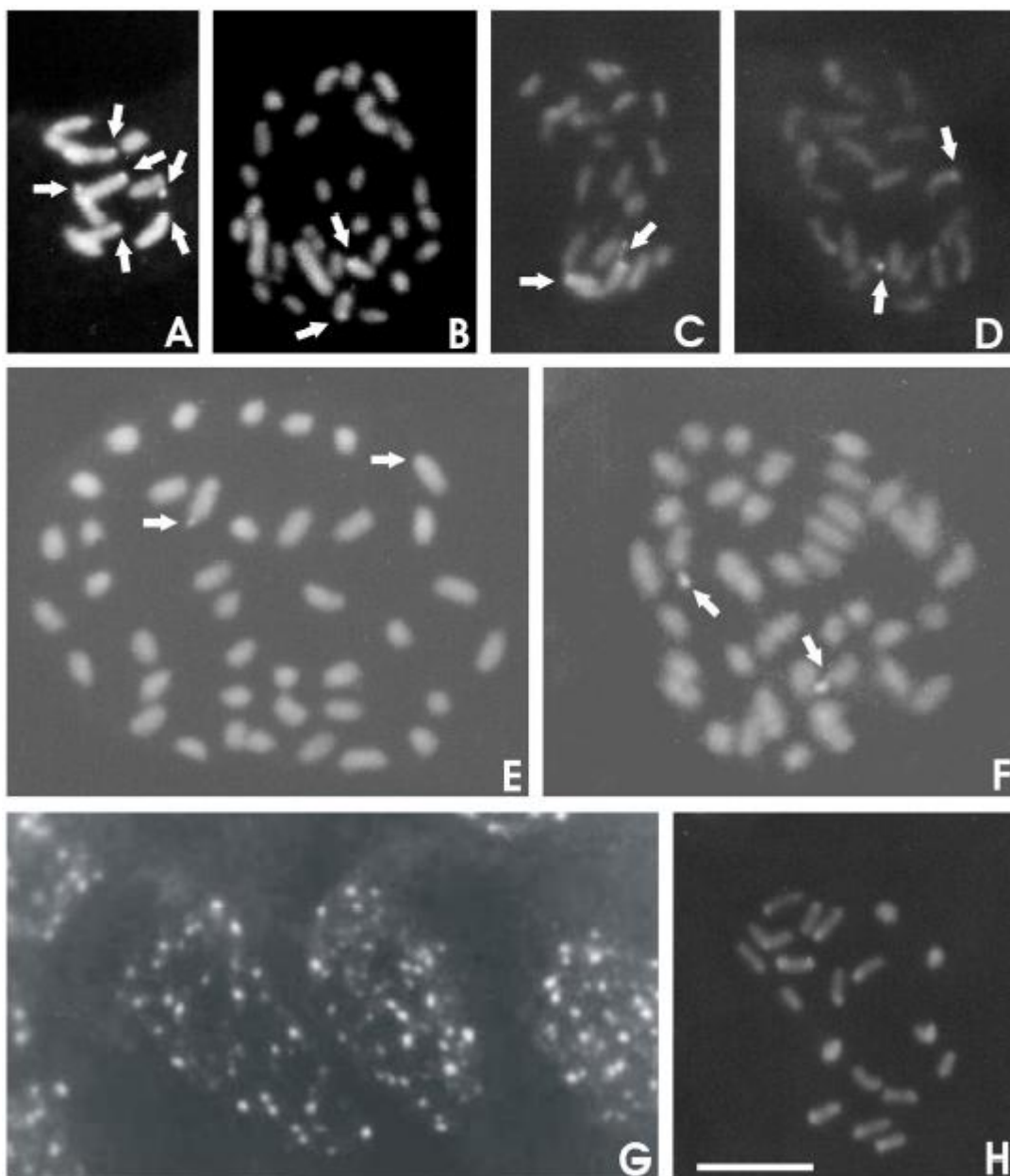


Figura 2. Fotos com coloração CMA₃/DAPI. A) *E. flavescens* (2n=10). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. B) *E. retroflexa* (2n=30). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. C) *E. sellowiana* (2n=20). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. D) *E. geniculata* (2n=20). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. E) *E. elegans* (2n=40). As setas indicam as bandas CMA₃⁺. F) *E. montana*. As setas indicam as bandas CMA₃⁺. G) *E. acutangula* com varias marcações CMA₃⁺. H) *E. sellowiana* exibindo várias marcações DAPI⁺ nas extremidades de vários cromossomos. A barra = 10 µm. As fotos E e F estão com o dobro de ampliação em relação as demais fotos.

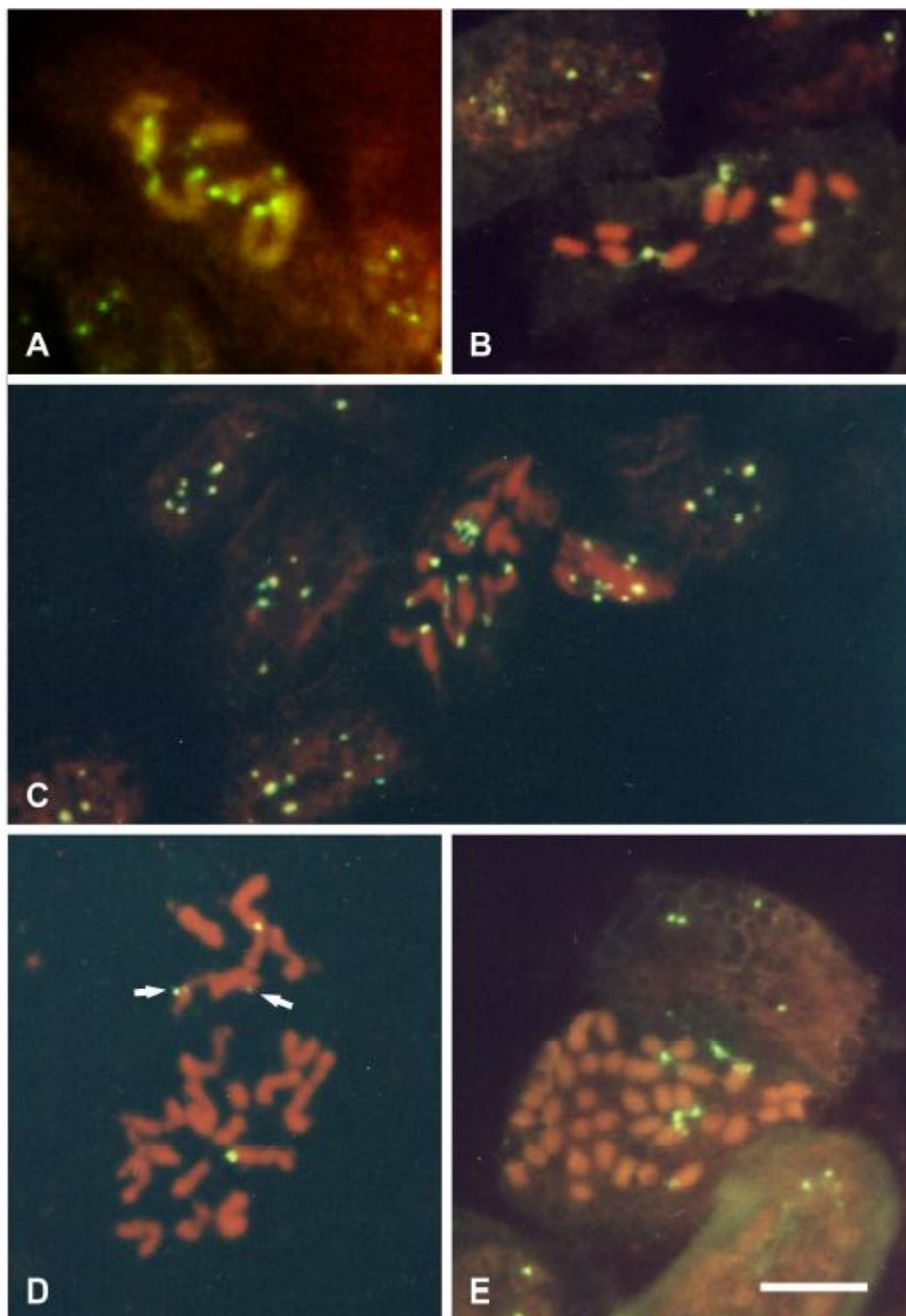


Figura 3. Fotos de Hibridação *in situ* com a sonda DNAr 45S A) *E. flavescens* ($2n=10$) com 10 sítios terminais. B) *E. maculosa* ($2n=10$) com quatro sítios. C) *E. sellowiana* ($2n=20$) com 10 sítios terminais, a foto mostra vários núcleos marcados. D) *E. geniculata* ($2n=20$) com quatro sítios marcados. As setas indicam os dois menores sítios. E) *E. montana* ($2n=40$) com quatro sítios. A barra = $13,5 \mu\text{m}$

CAPÍTULO 3

Eleocharis subarticulata (NEES) BOECKL: UMA ESPÉCIE DE CYPERACEAE
COM NÚMERO CROMOSSÔMICO REDUZIDO (n=3).*

Este artigo será enviado para publicação na revista Botanical Journal of the Linnean Society

Eleocharis subarticulata (NEES) BOECKL: UMA ESPÉCIE DE CYPERACEAE
COM NÚMERO CROMOSSÔMICO REDUZIDO (n=3).

Carlos R. M. da Silva¹, Socorro M. Gonzales² and André L. L. Vanzela^{1,3}

¹de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-970, Londrina, PR, Brazil. ²Instituto Politécnico Nacional, CIDIR, Durango 34000, México. ³E-mail para correspondência: andrevanzela@uel.br

Resumo

Eleocharis subarticulata é mais uma espécie de Cyperaceae a apresentar número cromossômico reduzido (n=3). Cariótipos com números reduzidos já foram descritos em *Rhynchospora tenuis* (n=2) e *Fimbristylis umbellaris* (n=3). As espécies de *Eleocharis* estudadas até o momento mostraram cariótipos variando de 2n=10 a 2n=ca.196, com número básico x=5. Neste trabalho foi realizada análise cariotípica convencional (mitose e meiose), de bandamento C-CMA₃/DAPI, além de hibridação *in situ* com sondas de DNAr 45S e de telômero (TTTAGGG). Os cromossomos não apresentaram nenhuma constrição, confirmando a característica holocêntrica dos cromossomos de Cyperaceae. O comportamento meiótico de *E. subarticulata* foi anormal, devido à ocorrência de um anel multivalente em metáfase I. Em anáfase I e metáfase II foram observados seis cromossomos migrando para cada um dos pólos, característico da meiose invertida, como era esperado para Cyperaceae. Dois mecanismos podem ser sugeridos para a redução do número cromossômico em *E. subarticulata*: i) simplóidia, envolvendo poucos cromossomos do complemento e ii) translocações múltiplas envolvendo poucos ou todos os cromossomos do complemento. O bandamento C-CMA₃/DAPI, mostrou apenas pequenos blocos ricos em CG, nas regiões terminais dos pares cromossômicos de tamanho intermediário e menor. A hibridação *in situ* com a sonda de DNAr 45S evidenciou sinais apenas nas extremidades, associados aos sinais ricos em GC. A sonda telomérica revelou sinais nas pontas de todos os cromossomos, além destes, no par maior foi encontrada uma marcação intersticial, fato que ainda não tinha sido visto em espécies vegetais com cromossomos holocêntricos, com cariótipos diferenciados por fusão/translocação.

Palavra-chaves: Cyperaceae. *Eleocharis*. FISH. Holocêntrico. Simplóidia. Telômero.

Introdução

Eleocharis subarticulata(Nees) Boeckl é uma espécie da família Cyperaceae caracterizada por colmos curtos (5 - 15 cm) e filiformes, circulares quando cortados em secção transversal, bainha púrpura e ápice sub-inflado normalmente obtuso. As espiguetas são fusiformes a lanceoladas, os aquênios obtusamente tri-convexos, obovóides, oliváceo-brilhantes a castanho, superfície reticulada, base do estilete esverdeado a ocrácea, inconspicuamente piramidal, com ápice alongado e contínuo com o ápice do aquênio, medindo cerca de 1/3 a 1/4 do comprimento deste (Svenson 1939). Com base nesta descrição detalhada, (este autor) considerou-se inserta a posição de *E. subarticulata* no gênero *Eleocharis*. Menapace (1993) incluiu esta espécie na série *Palustriformes* baseado em estudos micromorfológicos do aquênio, porém, Gonzales-Elizondo & Peterson (1997) incluíram a série *Palustriformes* na série *Eleocharis*.

Esta espécie é interessante não apenas por sua incerteza quanto à posição dentro do gênero, mas também por suas características citogenéticas peculiares. Como membro da família Cyperaceae, espera-se que *Eleocharis subarticulata* tenha cromossomos holocêntricos, meiose pós-reducional e perda de tétrades (veja Faulkner 1972). O número cromossômico para o gênero *Eleocharis* varia de $2n=10$ (Lewis *et al.* 1962) a $2n = ca.196$ (Hoshino 1987), com predominância de números múltiplos de $x=5$ ($2n=10, 20, 30, 40$ e 50), sendo este o possível número básico. A evolução cariotípica da família ocorre preferencialmente por agmatoploidia, simplíndia (Luceño & Guerra 1997) e poliploidia (Vanzela *et al.* 2000). Poucos estudos avançaram além da simples determinação do número cromossômico e do comportamento meiótico em membros de Cyperaceae e de outros vegetais com cromossomos holocêntricos. Dentre estes, podemos citar a determinação do padrão de bandas CMA₃/DAPI em *Drosera* -Droseraceae (Sheik e Kondo 1995) e pelo menos em três famílias heterocromáticas em *Rhynchospora* (Vanzela e Guerra 2000), bem como a localização de múltiplos sítios de DNAr 45S em posições terminais dos cromossomos *Rhynchospora* (Vanzela *et al.* 1998). Furuta e Hoshino (1999) localizaram sítios terminais de DNAr 18S e intersticiais de DNAr 5S em *Eleocharis* e *Carex*. Além desses segmentos, repetições teloméricas do tipo TTTAGGG foram

localizados nas pontas dos cromossomos de *Luzula purpurea* - Juncaceae (Fuchs *et al.* 1995) e *Rhynchospora tenuis* - Cyperaceae (Vanzela *et al.* 2003).

É pequeno o número de plantas conhecidas com número cromossômico reduzido, e em Cyperaceae, apenas em *Rhynchospora tenuis* com $2n=4$ e *Fimbristylis umbellaris* com $2n=6$ haviam sido descritas (Vanzela *et al.* 1996, Rath & Patnaik 1981, respectivamente). Porém, casos semelhantes foram reportados para outros gêneros de outras famílias como $2n=4$ em *Haplopappus gracilis*, Asteraceae (Jackson 1973), *Crocus candidus*, *C. graveolens*, *C. olivieri* e *C. speciosus* - Iridaceae (Özhatay 2002), and *Drosera roseana* - Droseraceae (Kondo *et al.* 1994).

Eleocharis subarticulata é a mais nova espécie de Cyperaceae a apresentar número cromossômico reduzido ($n=3$). Considerando que espécies com números tão baixos são excelentes para estudar a organização cariotípica e genômica decorrente da facilidade em reconhecer os pares cromossômicos, o objetivo deste estudo foi descrever o comportamento meiótico e realizar a caracterização citogenética baseado em coloração convencional, bandamento cromossômico e FISH com sondas de DNAr 45S e telomérica (TTTAGGG). A discussão foi conduzida baseada na organização e na evolução do cariótipo diante da provável redução do número básico $x=5$ proposto para o gênero e para a família bem como da posição citotaxonômica desta espécie no gênero *Eleocharis*.

Materiais e Métodos

Espécimes de *Eleocharis subarticulata* foram coletados em duas localidades distantes cerca de 50 Km uma da outra, no município de Ponta Grossa, Paraná, Sul do Brasil. Plantas foram cultivadas em vasos para a produção de novas raízes e anteras, e as exsiccatas depositadas no herbário da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil. Para obtenção de metáfases, as raízes foram pré-tratadas com 2 mM 8-hidroxiquinoleína por 24 horas, fixadas em Carnoy (álcool absoluto: ácido acético glacial, 3:1, v:v), e armazenadas em freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso. As raízes foram

digeridas por 3 horas em uma mistura composta por celulase 4% (v/v) e pectinase 40% (v/v). Para a coloração convencional, as raízes foram hidrolisadas em HCl 1M à 60°C por 11 min, dissecadas em uma gota de ácido acético 45% e esmagadas. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido. O material foi corado com Giemsa 2%. As lâminas foram montadas com Entellan e as células fotografadas com filme Kodak Imagelink HQ25 ISO. Para a obtenção do comprimento haplóide foram medidas 10 diferentes metáfases, com o mesmo nível de condensação.

Para a análise meiótica, espiguetas foram dissecadas e as anteras removidas foram diretamente fixadas em Carnoy, por 12 h., e armazenadas em freezer -20°C até o momento do uso. As anteras foram hidrolisadas em HCl 1M à 60°C por 5 minutos, lavadas e maceradas em uma gota de ácido acético 45%. As lamínulas foram removidas por congelamento em nitrogênio líquido e o material foi corado em Giemsa 2%. As lâminas foram montadas com Entellan e as células fotografadas com filme Kodak Imagelink HQ25 ISO.

O bandamento cromossômico foi feito em raízes pré-tratadas como descrito acima, porém, apenas digeridas em um mistura de 4% de celulase e 40% pectinase (v/v) a 37°C por 3h, lavadas e maceradas em uma gota de ácido acético 45%. Após a remoção da lamínula por congelamento, as lâminas foram guardadas por três dias no escuro, e incubadas em ácido acético 45%, Ba(OH)₂ 5%, e 2xSSC, como descrito por Schwarzacher *et al.* (1980), com modificações. As lâminas foram envelhecidas por mais três dias no escuro e coradas sequencialmente com CMA₃ 0,5 mg/mL por 1,5 h, lavadas em água destilada e imediatamente coradas com DAPI 2(µg/mL por 30 min. As lâminas foram montadas com mistura de glicerol/ tampão McIlvaine pH 7,0, 1:1, com 2.5 mM MgCl₂. As células foram observadas e fotografadas com filme Kodak T- max 100 ISO.

Para a hibridação *in situ* com fluorocromos foram seguidos os protocolos de Heslop-Harrison *et al.* (1991) e Cuadrado & Jouve (1994), com modificações. As sondas de DNAr 45S isolada de trigo e a de telômero (TTTAGGG) isolada de petúnia, foram marcadas com biotina-14-dATP por *nick translation*. Para a hibridação, foi preparada uma mistura contendo formamida (15 µL), polietileno glicol (6 µL), 20xSSC (3 µL), SDS 10% (1µL), DNA de timo de bezerro - 100 ng (1µL) e sonda

marcada - 100-200ng (4 μ L). A mistura foi desnaturada a 70°C por 10 minutos e imediatamente colocada no gelo. Em seguida, a mistura de hibridação foi colocada sobre o material e levada a um termociclador, programado a 90°C por 10 min, 50°C por 10 min e 38°C por 10 minutos. Após este tratamento, a hibridação ocorreu a 37°C *overnight* em câmara úmida. As lavagens pós-hibridação foram feitas com 2 banhos em 6xSSC 10 min cada, e um banho 4xSSC/ 0,2% Tween 20, todos a temperatura ambiente. As sondas foram detectadas com avidina-FITC, lavadas em 4xSSC/0.2% Tween 20 e as lâminas montadas em uma solução composta por 12,5 μ l de antifade, 12,5(μ l de glicerol 50% em tampão McIlvaine, pH 7,0, com 2,5 mM MgCl₂, e 1 μ l de iodeto de propídio (50 μ g/ml). As fotografias foram feitas com o filme Kodak Proimage color 100 ISO.

Resultados e Discussão

Coloração convencional e redução do número cromossômico

A análise citogenética convencional evidenciou em *Eleocharis subarticulata* $2n=6$ cromossomos, constituindo um cariótipo composto por um par maior (2,65 (μ m)), um intermediário (2,48 μ m) e outro menor (2,08. μ m) e tamanho total do complemento haplóide de 7,21 (μ m). Constrições primárias e satélites não foram observadas nos cromossomos metafásicos (Figura 1A). Em anáfase, os cromossomos migraram paralelos entre si na placa equatorial, exibindo um comportamento típico de cromossomos holocêntricos. A ocorrência de cromossomos holocêntricos foi primeiramente demonstrada por Håkansson (1954) em *Eleocharis palustris* após a irradiação de espiguetas jovens e a observação do comportamento normal dos fragmentos cromossômicos durante o ciclo celular. No entanto, Sharma e Bal (1954) e Sanyal e Sharma (1972) sugeriram que algumas espécies, em alguns gêneros de Cyperaceae, possuem cromossomos com centrômero localizado. Os dados apresentados aqui consistem numa nova evidência da ocorrência de cromossomos holocêntricos em *Eleocharis*.

Os números cromossômicos do gênero *Eleocharis* variam de $2n=10$ (Lewis *et al*, 1962) a $2n=ca.196$ (Hoshino 1987), sendo que em muitas espécies foram encontrados números derivados de fusão e/ou fissão cromossômica, como $2n = 20$ e 21 em *E. atropurpurea* (Nijalingappa 1973) e $2n=15$

e 16 em *E. palustris* (Strandhede 1965). Outras espécies apresentam cariótipos diplóides e poliplóides, como $2n = 10$ e $2n = 20$ em *E. geniculata* (Nijalingappa 1973). Mas, em geral, os cariótipos mostram predominantemente números múltiplos de $x=5$, considerado o provável número básico para *Eleocharis*. A agmatoploidia e simplóidia têm sido sugeridas como eventos comuns neste gênero, bem como na família Cyperaceae (Wahl 1940; Davies 1956; Faulkner 1972; Hoshino 1987 e Luceno *et al.* 1998) o que permite sugerir que o número reduzido $n=3$ tenha se originado a partir de $x=5$. Este tipo de redução foi descrito para Cyperaceae em *Rhynchospora tenuis*, sendo a redução de $n=5$ para $n=2$ (Vanzela *et al.* 1996), mas já havia na literatura um registro em *Fimbristylis umbellaris* com $n=3$ (Rath & Patnaik 1981), porém sem uma discussão sobre a provável causa. Redução cromossômica também foi descrita por Kondo & Segawa (1988) e Kondo *et al.* (1994), em *Drosera roseana*, um membro da família Droseraceae que também possui cromossomos holocêntricos. De acordo com os autores citados a cima os números cromossômicos $n=3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12$ e 13 , são encontrados em *Drosera*, e mecanismos de fissão (agmatoploidia) e fusão (simplóidia) estão envolvidos nas origens destes cariótipos.

O estabelecimento de espécies cujos cariótipos foram modificados por eventos, tais como a perda de segmentos de DNA e a diminuição do número de cromossomos por fusões e/ou translocações, parece não ser apenas uma especialização de grupos de plantas com cromossomos holocêntricos. No gênero *Crepis* (Asteraceae), um grupo com cromossomos monocêntricos, os cariótipos mais primitivos e menos especializado, e comuns em plantas perenes têm $n=6$ cromossomos, enquanto os mais especializados com $n=3$ ocorrem predominantemente em plantas anuais (veja Babcock *et al.* 1942). Outro exemplo, que mostra redução do número cromossômico, foi descrito por Goldblatt *et al.* (2002) em espécies africanas do gênero *Moraea* (Iridaceae). Apesar deste grupo possuir cromossomos monocêntricos, a evolução cariotípica foi marcada por uma série de números cromossômicos ($n=4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$), sendo $n=6$ o número mais freqüente. No entanto, a associação de dados citogenéticos e moleculares indicou $n=10$ como o número cromossômico

ancestral para este gênero, sendo os cariótipos com números reduzidos considerados derivados. Neste contexto, é possível aceitar que $n=3$ em *Eleocharis subarticulata* seja um cariótipo derivado.

A diferenciação cariotípica provocada por rearranjos cromossômicos (agmatoploidia e simploídia) é um evento muito comum em Cyperaceae, mas pouco freqüente em *Eleocharis*, haja vista apenas os exemplos de $2n=15$ e 16 em *E. palustris* (Strandhede 1965) e $2n=20$ e 21 em *E. atropurpurea* (Nijalingappa 1973) e *E. aciculares f. longiseta* (Yano *et al.* 2004). Isto concorda com habilidade dos fragmentos ou cromossomos fusionados se comportarem normalmente nas divisões celulares subseqüentes nos organismos que possuem cromossomos holocêntricos (Vanzela e Colaço 2002).

Comportamento Meiótico

Todas as 435 células meióticas analisadas mostraram $n=3$, mas com um comportamento meiótico incomum. Os cromossomos em paquíteno, mostraram nenhuma ou poucas extremidades, onde o esperado eram pelo menos seis, considerando que deveria haver três bivalentes (Figura 2A e 2B). Em diplóteno os cromossomos parecem estar unidos formando uma única unidade, geralmente contorcida em alças. Em células com cromossomos mais condensados foi possível visualizar estruturas separadas, mas em geral a associação foi visualizada (veja as Figuras 2C a 2F). Na metáfase I, a associação cromossômica foi mais evidente, uma vez que apareceram formando um anel multivalente. Os cromossomos permaneceram associados ponta-a-ponta formando um anel no plano equatorial (Figuras 2G e 2H) e no estágio subseqüente, todos os cromossomos apareceram conectados por filamentos finos ou completamente desconectados, como seis estruturas independentes (Figura 2I). Após esta fase, as cromátides irmãs aparecem segregando em anáfase (Figura 2J). onde seis cromossomos foram visualizados tanto em metáfase I quanto em metáfase II, indicando que houve a separação de cromátides irmãs e não de cromossomos homólogos (veja as Figuras 2I e 2J). O comportamento meiótico de *E. subarticulata* foi similar ao descrito por Wahl (1940), como esperado para meiose invertida. A associação de bivalentes formando a "estrutura em caixa" também é

empregada como um critério para indicar a presença de meiose pós-reducional em cromossomos holocêntricos, mas ao menos em *E. subarticulata*, a estrutura em caixa não pode ser utilizada como um indicativo da ocorrência de meiose pós-reducional, devido exatamente à formação do multivalente em anel. No entanto, dados obtidos no presente trabalho permitem apontar que a segregação de cromátides irmãs ocorreu na primeira fase da meiose. Após a metáfase II foi observada a migração de três grupos cromossômicos para um dos pólos e a permanência de um grupo isolado (Figura 2L), configurando o início da degeneração de três dos quatro grupos e a perda da tétrade. Como esperado para Cyperaceae, *E. subarticulata* também mostrou ausência de tétrade, com geração de um grão de pólen por cada célula mãe do pólen. Isto ocorre devido ao fato de três dos quatro núcleos serem degenerados completamente, e o núcleo restante originar por mitose polínica os núcleos vegetativo e generativo (Figuras 2M e 2N).

A descoberta deste comportamento meiótico em *E. subarticulata* levanta dúvidas sobre a gama de mecanismos envolvendo a evolução cariotípica em Cyperaceae. Até este momento, eram admitidos apenas agmatoploidia (fissão), simploidia (fusão) e poliploidia, mas este caso é muito similar à formação de translocações múltiplas encontradas em *Oenothera*, envolvendo alguns ou todos os cromossomos do complemento (Cleland 1923). Com base nesta idéia, é possível sugerir a ocorrência de dois possíveis mecanismos de fusão cromossômica em holocêntricos de Cyperaceae: i) simploidia, responsável pela redução de um ou poucos cromossomos e a formação de tri- e/ou tetravalentes (Luceño e Guerra 1997) e ii) translocações múltiplas, envolvendo todos os cromossomos do complemento, e a formação de um multivalente em anel na meiose como observado em *E. subarticulata*. Até o momento não é possível fornecer mais informações sobre a extensão populacional deste evento, uma vez que indivíduos de populações muito próximas foram analisados.

Bandamento cromossômico e Hibridação in situ

O bandamento C-CMA₃/DAPI realizado em *E. subarticulata* mostrou apenas pequenos blocos ricos em CG, nas regiões terminais dos pares cromossômicos de tamanho intermediário e menor,

muito similar ao encontrado em *Rhynchospora tenuis*, $2n = 4$ (Vanzela e Guerra 2000). Informações sobre o padrão de bandamento em holocêntricos são escassas na família Cyperaceae. Greilhuber (1995) reportou a ocorrência de diversas bandas terminais ricas em CG em *Carex*, provavelmente relacionadas com NORs, e Vanzela e Guerra (2000) encontraram blocos heterocromáticos variando em composição, ($CMA_3^+/DAPI^-$, $CMA_3^+/DAPI^+$ e $CMA_3^-/DAPI^+$) tamanho e localização em diferentes espécies de *Rhynchospora*. Os dados obtidos neste trabalho indicam que mecanismos de amplificação de DNA repetitivo que eventualmente aparecem em algumas espécies, não acontecem em *E. subarticulata*, a qual apenas exhibe blocos terminais muito pequenos $CMA_3^+/DAPI^-$.

FISH com sonda de DNAr 45S revelou sinais terminais nos pares cromossômicos de tamanho intermediário e menor. Vanzela *et al.* (1998) e Vanzela *et al.* (2003) mostraram cariótipos de nove espécies de *Rhynchospora*, a ocorrência de múltiplos e terminais sítios de DNAr 45S. Estes sugeriram uma tendência geral para o acúmulo de genes ribossomais em cromossomos holocêntricos de Cyperaceae. Independente da redução cromossômica ter ocorrido por simplóidia ou translocações múltiplas, o DNAr 45S foi mantido nas pontas de dois pares cromossômicos, acompanhando a tendência de acúmulo desses sítios em posições terminais, observados até o momento em Cyperaceae (Vanzela *et al.* 1998, Furuta e Hoshino 1999, Vanzela *et al.* 2003).

FISH com sonda telomérica revelou sinais terminais em todos os cromossomos, e um sinal intersticial no meio do par cromossômico maior. A tentativa de buscar sítios teloméricos ectópicos em cariótipos com número cromossômico reduzido foi feita por Fuchs *et al.* (1995) em *Luzula purpúrea* e por Vanzela *et al.* (2003) em *Rhynchospora tenuis*, porém sem sucesso. A ocorrência deste sítio ectópico em *E. subarticulata* poderia sugerir um processo de fusão, mas não confirma se o evento ocorreu por simplóidia ou por translocações múltiplas, como sugerido pela análise meiótica. No entanto, vale lembrar que sítios ectópicos não aparecem apenas como remanescentes de rearranjos cromossômicos, mas também devido a um processo aleatório de replicação *slippage* (veja Biessmann e Mason 1994).

Mudanças cromossômicas que produzem uma brutal redução no número cromossômico não são frequentes, o que explica o baixo número de espécies com $n=2$ e $n=3$. Além disso, há poucos exemplos onde os pesquisadores acompanharam com sucesso o caminho da redução. Exemplos ilustrativos foram o da fusão em tandem que originou *Haplopappus gracilis* com $n=2$ a partir de *H. ravenii* com $n=4$ (Ikeda 1987), e uma série de translocações desiguais que originou a raça cromossômica com $n=2$ em *Ornihtogalum tenuifolium* (Stedje 1988 e 1989). Neste contexto, é possível esperar que qualquer modificação capaz de gerar isolamento após uma redução numérica brutal, assim como o aparecimento de $n=3$ em *E. subarticulata* pode causar uma barreira, é capaz de produzir alterações morfológicas, esta pode ser a razão pela qual muitos taxonomistas têm dificuldade em identificar e delimitar *E. subarticulata*, como é o caso da incerteza observada no sistema de Svenson (1939), sua realocação na série *Palustriformes* subsérie *Truncatae* por Manapace (1993) e sua nova posição na série *Eleocharis* subsérie *Truncatae* determinada por Gonzáles-Elizondo e Peterson (1997). Finalizando, a falta de mais marcadores cromossômicos impede que, no momento, possamos sugerir qual o caminho desta redução e qual espécie poderia ter dado origem a *E. subarticulata*. No entanto, esta descoberta abre caminho para investir em trabalhos futuros envolvendo a hibridação genômica *in situ* e isolamento cromossômico para pintura cromossômica.

CAPES e Fundação Araucária/ProPPG-UEL pelo suporte financiamento ao projeto.

Referências Bibliográficas

- Babcock EB, Stebbins GL, Jenkins JA. 1942.** Genetic evolutionary processes in *Crepis*. *Am. Nat.* **76**: 337-363.
- Biessman H, Mason JM. 1994.** Telomeric repeat sequences. *Chromosoma* **103**:154-161.
- Cleland RE. 1923.** Chromosome arrangements during meiosis in certain *Oenotheras*. *Amer. Nat.* **57**:562-566.
- Cuadrado A, Jouve N. 1994.** Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 5x-Triticale. *Crom. Res.* **2**: 231-338.
- Davies EW. 1956.** Some new chromosome numbers in the Cyperaceae. *Watsonia* **3**:242-243.
- Faulkner JS. 1972.** Chromosome studies on *Carex* section *Acutae* in north-west Europe. *Bot Jour Linn Soc* **65**:271-301.
- Fuchs J, Brandes A, Schubert I. 1995.** Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Pl. Syst. Evol.* **196**:227-241.
- Furuta K, Hoshino T. 1999.** Localization of the 18S and 5S rDNA on the chromosomes with non-localized centromere in Cyperaceae. XVI International Botanical Congress. Abstract Number: 4331 Poster No.=1829.
- Goldblatt P, Savolainen V, Porteous O, Sostaric I, Powell M, Reeves G, Manning JC, Barraclough TG, Chase MW. 2002.** Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Mol. Phyl. Evol.* **44**:341-360.
- Gonzales-Elizondo MS, Peterson PM. 1997.** A classification of the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). *Taxon* **46**:433-449.
- Greilhuber J. 1995.** Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In P.J. Randall, P.J. Cribb, D.F. Cutler and C.J. Humphries (eds.). *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew 379-414.

- Hakansson A. 1954.** Meiosis and pollen mitosis in X-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. *Hereditas* **40**: 325-345.
- Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch IJ. 1991.** *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique* **3**:106-109.
- Hoshino T. 1987.** Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. *Bull. Okayama Uni. Sic.* **22**:305-312.
- Ikeda H. 1987.** Cytogenetic studies on the chromosome complements of *Haplopappus gracilis* (2n=4) and *H. ravenii* (2n=8). *J. Sci. Hiroshima Univ., ser B, Div. 2*, **21**:67-104.
- Jackson RC. 1973.** Chromosomal evolution in *Haplopappus gracilis*: a centric transposition race. *Evolution* **27**: 243-256.
- Kondo K, Segawa M. 1988.** A cytotaxonomic study in artificial hybrids between *Drosera anglica* Huds. and its certain closely related species in series *Drosera*, section *Drosera*, subgenus *drosera*, *Drosera*. *La Kromosomo* **11-51-52**: 1697-1709.
- Kondo K, Sheik AS, Hoshi Y. 1994.** New finding of another 2n=6 species in the angiosperms, *Drosera roseana* Marchant. *Chrom. Inf. Serv.* **57**:3-4.
- Lewis WH, Stripling HL, Ross RG. 1962.** Chromosome numbers for some angiosperms of the southern United States and Mexico. *Rhodora* **758**: 147-161.
- Luceno M, Guerra M. 1997.** Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclature proposal. *Caryologia* **49**:301-309.
- Luceno M, Vanzela ALL, Guerra M. 1998.** Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can. J. Bot.* **76**:440-449.
- Menapace FJ. 1993.** Achene micro-morphology as a systematic aid to the series placement of Svenson's undesigned *Eleocharis* (Cyperaceae) achenes for systematic potential. *Canadian Journal of Botany* **69**:1533-1541.
- Nijalingappa BHM. 1973.** Cytological studies in *Eleocharis*. *Caryologia* **26**:513-520.

- Özhatay N. 2002.** Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. *Pure Appl Chem* **74**:547-555.
- Rath SP, Patnaik SN. 1981.** Cytological studies in Indian species of *Fimbristylis* Vahl. (Cyperaceae) with special reference to taxonomy. In: Perspectives in cytology and genetics. Hindasia publisher, New Delhi. (Manna, G. K. and Sinha, U, eds.) **3**:175-181.
- Sanyal B, Sharma AK. 1972.** Cytological studies in Indian Cyperaceae. I Tribe Scirpeae. *Cytologia* **37**:13-32.
- Schwarzacher TP, Ambros P, Schweizer D. 1980.** Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl Syst Evol* **134**:293-297.
- Sharma AK, Bal AK. 1954.** A cytological investigation on some of the Indian members of the family Cyperaceae. *Proc. Indian Sci. Congr. Assoc.* **41**:147.
- Sheikh SA, Kondo K. 1995.** Differential staining with orcein, giemsa CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Am. J. Bot.* **82**:1278-1286.
- Svenson HK. 1939.** Monographic studies in the genus *Eleocharis* V. *Rhodora.* **41**: 1-110.
- Stedje B. 1988.** A new low chromosome number for *Ornithogalum tenuifolium* (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* **161**:65-69.
- Stedje B. 1989.** Chromosome evolution within the *Ornithogalum tenuifolium* complex (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* **166**:79-89.
- Strandhede SO. 1965.** Chromosome studies in *Eleocharis* suber. *Palustris*. I. Meiosis in some forms with 15 chromosomes. *Hereditas* **53**: 43-47.
- Vanzela ALL, Guerra M, Luceno M. 1996.** *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes ($n = 2$). *Cytobios* **88**: 219-228.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Jouve N, Luceno M, Guerra M. 1998.** Multiple locations of the rDNA in species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chrom Res* **6**:345-349.

- Vanzela ALL, Luceno M, Guerra M. 2000.** Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot Jour Linn Soc* **134**:557-566.
- Vanzela ALL, Guerra M. 2000.** Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology*. **23**:453-456.
- Vanzela ALL, Colaço W. 2002.** Mitotic and meiotic behavior of γ irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchosporapubera* (Cyperaceae). *Acta Scientiarum*. **2**:611-614.
- Vanzela ALL, Cuadrado A, Guerra M. 2003.** Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* **26**:199-201.
- Wahl HA. 1940.** Chromosome numbers and meiosis in the genus *Carex*. *Am. J. Bot.* **27**:548-470.
- Yano O, Katsuyama T, Tsubota H, Hoshino T. 2004.** Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. *J. Plant Res.* **117**:409-419.

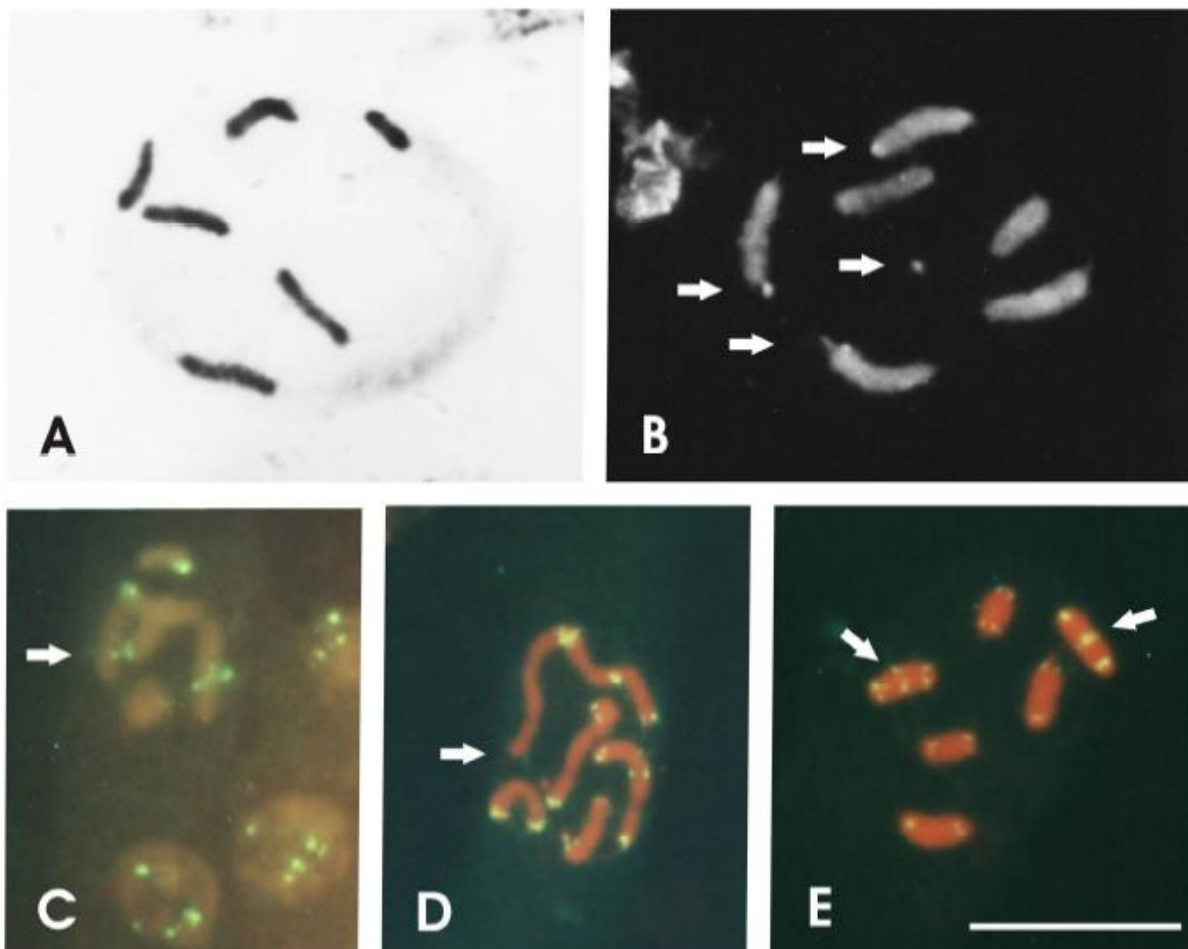


Figura 1. A) pró-metáfase de *E. subarticulata*. B) Marcações CMA3+. As setas indicam as regiões ricas em CG. C) Hibridação com sonda de DNAr 45S. A seta indica a metáfase com os quatro sítios terminais. D) Hibridação com sonda de telômero. A seta indica ausência de telômero, decorrente do sítio de DNAr 45S. E) Metáfase com cromossomos marcados com a sonda de telômero. As setas indicam as marcações intersticiais nos cromossomos maiores.

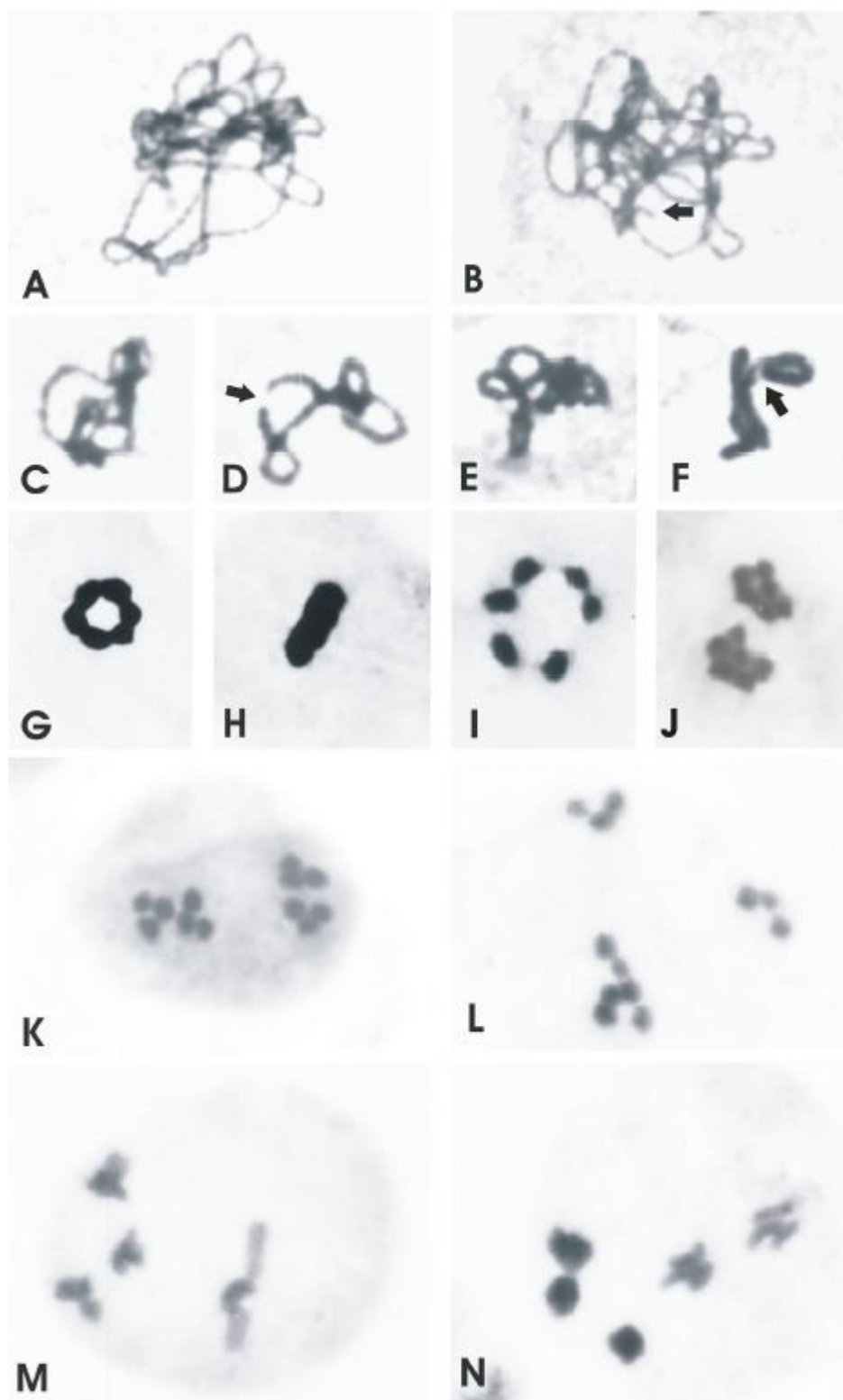


Figura 2. A e B) Paquíteno. A seta indica a ponta de um cromossomo. C, D, E e F) Diplóteno. As setas indicam associação entre os cromossomos. G e H) Metáfase I. I) Diacinese. J) Anáfase I. K e L) Metáfase II. M e N) Mitose polínica.

CAPÍTULO 4
CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- a) Neste estudo foram analisadas doze espécies num total de 24 populações do gênero *Eleocharis*. Nenhuma destas exibiu constrição primária nos cromossomos e, em *E. subarticulata* onde foi analisada sua meiose, esta foi invertida, reforçando o comportamento típico de espécies com cromossomos holocêntricos. Assim, os dados resultantes deste trabalho confirmam a condição holocêntrica dos cromossomos neste gênero.
- b) Os números cromossômicos no gênero *Eleocharis* variaram de $2n = 6$ a $2n = 54$. Nas doze espécies analisadas apenas três não foram múltiplas de cinco. A alta frequência de números múltiplos de $x=5$ pode ser também observada em gêneros próximos como *Rhynchospora* e *Fimbristylis*. Essas informações levam à conclusão de que $x=5$ é o provável número básico de *Eleocharis*.
- c) Regiões heterocromáticas ricas em CG foram localizadas apenas nas pontas dos cromossomos, porém em gêneros próximos, como em *Rhynchospora*, estas regiões foram encontradas também intersticialmente. As seqüências de DNAr 45S também foram observadas nas extremidades dos cromossomos, assim com ocorre na grande maioria dos organismos.
- d) Em *E. subarticulata* a seqüência telomérica marcou todas as extremidades dos cromossomos com uma marcação intersticial no par maior. Marcações intersticiais teloméricas já foram localizadas em cromossomos monocêntricos. Sendo assim, a distribuição de heterocromatina ricas em CG e DNAr e seqüências teloméricas dos cromossomos holocêntricos de *Eleocharis* é similar à dos monocêntricos, ou seja, o padrão de distribuição dessas seqüências independe de atividade cinética dos cromossomos.
- e) Através da análise do comportamento meiótico encontrado em *E. subarticulata*, que é muito semelhante ao encontrado em *Oenothera*, acreditamos que o processo de translocações múltiplas também ocorreu em *Eleocharis subarticulata*.
- f) As medições cromossômicas foram feitas em dez espécies, onde oito espécies mostraram diminuição gradual no tamanho, sendo que uma exibiu cromossomos muito pequenos com tamanhos muito próximos e outra um par muito maior que os demais do complemento. Estes tipos de variações ocorreram independentemente do número cariotípico. As espécies

da seção *Eleocharis* e seção *Eleogenus* apresentaram variação gradual e as espécies da seção *Limnochloa* apresentaram cromossomos pequenos com tamanho muito próximo.

- g) As variações observadas nos números cromossômicos sugerem que a poliploidia possui maior importância na evolução cariotípica de *Eleocharis*, mas a simplóidia, agmatoploidia e disploidia podem também atuar na diferenciação dos cariótipos.
- h) Os dados citológicos mostrados neste trabalho corroboram os de Yano *et al.* (2004), os quais separam as espécies da seção *Limnochloa* daquelas da seção *Eleocharis*, por possuírem cromossomos numerosos e extremamente pequenos, característica que parece definir a primeira seção. Assim sendo, a análise citogenética pode ser utilizada neste caso como um caráter micromorfológico muito útil na taxonomia.

REFERÊNCIAS

- BABCOCK E. B.; STEBBINS, G. L.; JENKINS J. A. Genetic evolutionary processes in *Crepis*. *Am. Nat.* 76: 337-363. 1942.
- BERNARDINI J. Studies of the kinetochore in *Eleocharis macrostachya* Britt. *Proc. Minnesota Acad. Sci.* 27 p.104-114. 1959.
- BIESSMAN H.; MASON J.M. Telomeric repeat sequences. *Chromosoma* 103 p.154-161. 1994.
- BIR S. S.; CHEEMA P. SIDHU M. K.; Chromosomal Analysis of *Fimbristylis* Vahl in Punjab, North West India. *Proc. Indian Natn. Sci Acad.* B58 1 p.63-70. 1992.
- BLAKE S. T. A monograph of the genus *Eleocharis* in Australia and New Zeland. *Proceedings Royal Society Queensland* 50 p. 88-132. 1939.
- BROWN G. R.; AMARASINGHE V.; KISS G.; CARLSON J. E. Preliminary karyotype and chromosomal localization of ribosomal DNA sites in white spruce using fluorescence *in situ* hybridization. *Genome* 36 p.310-316. 1993.
- BRUHL J. J. Amphicarpny in the Cyperaceae, with novel variation in the wetland sedge *Eleocharis caespitosissima* Backer. *Australian Journal of Botany* 42 p.441-448. 1994.
- BRUHL J. J. Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. *Australian Systematic Botany* 8 (2) p.125-305. 1995.
- CAMACHO J. P. M.; BELDA J.; CABRERO J. Meiotic behavior on the holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta-Heteroptera) analyzed by C-banding and silver impregnation. *Can. J. Genet. Cytol.* 27 p.490-497. 1985.
- CASTRO D.; CAMARA A.; MALHEIROS N. X-rays in the centromere problem of *Luzula purpurea* Link. *Gen. Iber.* 1 p.49-54. 1949.
- CLELAND R. E. Chromosome arrangements during meiosis in certain *Oenotheras*. *Amer. Nat.* 57:562-566. 1923.

CUADRADO A.; JOUVE N. Mapping and organization of highly-repeated DNA sequences by means of simultaneous and sequential FISH and C-banding in 5x-Triticale. *Crom. Res.* n. 2, p. 231-338. 1994.

DAVIES E. W. Some new chromosome numbers in the Cyperaceae. *Watsonia* 3 p. 242-243. 1956.

FAULKNER J. S. Chromosome studies on *Carex sextion Acutae* in north-west Europe. *Bot Jour Linn Soc* 65 p.271-301. 1972.

FARIA AD (1998). O gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo. Mestrado em Biologia Vegetal. Dissertação de Mestrado, Unicamp. FUCHS J.; Brandes A.; Schubert I. Telomere sequence localization and karyotype evolution in higher plants. *Pl. Syst. Evol.* 196 p. 227-241. 1995.

FURUTA K.; HOSHINO T. Localization of the 18S and 5S rDNA on the chromosomes with non-localized centromere in Cyperaceae. XVI International Botanical Congress. Abstract Number: 4331 Poster No.=1829. 1999.

GERLACH W. L.; BEDBROOK J. R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic. Acid. Res.* 7 p.1869-1885. 1979.

GREILHUBER J. Chromosomes of the monocotyledons (general aspects). In P.J. Randall, P.J. Cribb, D.F. Cutler and C.J. Humphries (eds.). *Monocotyledons: systematics and evolution*. Royal Botanic Gardens, Kew p.379-414. 1995.

GOLDBLATT P.; SAVOLAINEN V.; PORTEOUS O.; SOSTARIC I.; POWELL M.; REEVES G.; MANNING J. C.; BARRACLOUGH T. G.; CHASE M. W. Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Mol. Phyl. Evol.* 44 p.341-360. 2002.

GONZALES-ELIZONDO M. S.; PETERSON P. M. A classification of the supraspecific taxa in *Eleocharis* (Cyperaceae). *Taxon* 46 p.433-449. 1997.

GUAGLIANONE R. E.; LAURA P. D.; POGGIO L. Estudios Cromossômicos em espécies de *Rhynchospora* y *Pleurostachys*. *Soc. Argent. Bot.* n. 35 (3-4), p. 325-330. 2000.

GUERRA M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Gent. Mol. Biol.* 23 (4) p.1029-1041. 2000.

HARMS L. J. Cytotaxonomic Studies in *Eleocharis* Subser. Palustres: Central United States Taxa. Amer. J. Bot. 55 (8) p.966-974. 1968.

HAKANSSON A. Meiosis and pollen mitosis in X-rayed and untreated spikelets of *Eleocharis palustris*. Hereditas 40 p.325-345. 1954.

HAKANSSON A. Holocentric chromosomes in Cyperaceae. Hereditas 11 p.182-192. 1958.

HESLOP-HARRISON J. S.; SCHWARZACHER T.; ANAMTHAWAT-JONSSON K.; LEITCH A. R.; SHI M.; LEITCH I. J. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. Technique 3 p.106-109. 1991.

HOSHINO T. Karyomorphological studies on 6 taxa of *Eleocharis* in Japan. Bull. Okayama Uni. Sic. 22 p.305-312. 1987.

HOSHINO T.; RAJBHANDARI K. R.; OHBA H. Cytological studies of eleven species of Cyperaceae collected from central Nepal. Cytologia. 26 p.219-224. 2000.

HUGHES-SCHRADER S. Cytology of coccids. Adv. Genet. 2 p.127-203. 1948.

IKEDA H. Cytogenetic studies on the chromosome complements of *Haplopappus gracilis* ($2n=4$) and *H. ravenii* ($2n=8$). J. Sci. Hiroshima Univ., ser B, Div. 2, 21 p.67-104. 1987.

JAMES H. R.; VENKETESWARAN S. DNA Replication, H-cRNA in situ Hybridization and C-Band Patterns in the Polycentric Chromosomes of *Luzula purpurea* Link, Chromosoma 74 p.337-340. 1979.

JACKSON R.C. Chromosomal evolution in *Haplopappus gracilis*: a centric transposition race. Evolution 27 p.243-256. 1973.

KONDO K.; SEGAWA M. A cytotaxonomic study in artificial hybrids between *Drosera anglica* Huds. and its certain closely related species in series *Drosera*, section *Drosera*, subgenus *drosera*, *Drosera*. La Kromosomo 11-51-52 p.1697-1709. 1988.

KONDO K.; SHEIK S. A.; HOSHI Y. New finding of another $2n=6$ species in the angiosperms, *Drosera roseana* Marchant. Chrom. Inf. Serv. 57 p.3-4. 1994.

KOYAMA T. Classification of the family Cyperaceae (I). Jour. Fac. Sci. Univ. Tokyo 8 p.37-148. 1961.

KUKKONEN I. On the genus *Eleocharis* (Cyperaceae) in Flora Iranica area, with revised infrageneric classification and nomenclature. Ann. Bot. Fennici 27 p.109-117. 1990.

LEWIS W. H.; STRIPLING H. L.; ROSS R. G.; Chromosome numbers for some angiosperms of the southern United States and Mexico. *Rhodora* 758 p. 147-161. 1962.

LOVE A.; LOVE D.; RAYMOND M. Cytotaxonomy of *Carex* section *Cappilares*. Canadian Journal of Botany 35 p.715-761. 1957.

LUCENO M. CASTROVIEJO S. Agmatoploidy in *Carex laevigata* (Cyperaceae) Fusion and fission of chromosomes as the mechanism of cytogenetic evolution in Iberian populations. *Pl. Syst. Evol.* 177 p.149-159. 1991.

LUCENO M.; GUERRA M. Numerical variation in species exhibiting holocentric chromosomes: a nomenclature proposal. *Caryologia* 49 p.301-309. 1997.

LUCENO ML; VANZELA A. L. L.; GUERRA M. Cytotaxonomic studies in Brazilian *Rhynchospora* (Cyperaceae), a genus exhibiting holocentric chromosomes. *Can. J. Bot.* 76 p.440-449. 1998.

MENAPACE F. J. A preliminary micromorphological analysis of *Eleocharis* (Cyperaceae) achenes for systematic potential. *Can. J. Bot.* 69 p. 1533-1541. 1991.

MENAPACE F. J. Achene micro-morphology as a systematic aid to the series placement of Svenson's undesignated *Eleocharis* (Cyperaceae) achenes for systematic potential. *Canadian Journal of Botany* 69 p.1533-1541.1993.

MOHLENBROCK R. H. The illustrated Flora of Illinois. Sedges - Cyperus to Scleria. London: Southern Illinois University Press. 1976.

NIJALINGAPPA B. H. M. Cytological studies in *Eleocharis*. *Caryologia* 26 p.513-520. 1973.

NIJALINGAPPA B. H. M. Autotetraploidy in *Fimbristylis falcate* (Vahl) Kunth (Cyperaceae). *Proc. Indian Acad. Sci., Vol, 85B* 1 p.21-24. 1977.

NOKKALA S. Restriction of kinetic activity of holokinetic chromosomes in meiotic cells and its structural basis. *Hereditas* 102 p.85-88. 1985.

NORDENSKIÖLD H. Cyto-taxonomical studies in the genus *Luzula* I. Somatic chromosomes and chromosome numbers. *Hereditas* 37 p.325-355. 1951.

ÖZHATAY N. Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. *Pure Appl Chem* 74 p.547-555. 2002.

PANZERA F.; ÁLVAREZ F.; SÁNCHEZ-RUFAS J.; PÉREZ R.; SUJAS J. A.; SCVORTZOFF E.; DUJARDINNI J. P.; ESTRAMIL E.; SALVATELLA R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). *Genoma* 35 p.1068-1074. 1992.

PAZI B.; PLITMANN U. Holocentric chromosome behavior in *Cuscuta* (Cuscutaceae). *Pl. Syst. Evol.* 191 p.105-109. 1994.

PEDERSEN C.; LINDE-LAURSEN I. Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. *Chromo. Res.* 2 p.65-71. 1994.

RATH S. P.; PATNAIK S. N. Cytological studies in Indian species of *Fimbristylis* Vahl. (Cyperaceae) with special reference to taxonomy. In: *Perspectives in cytology and genetics*. Hindasia publisher, New Delhi. (Manna, G. K. and Sinha, U, eds.) 3 p. 175-181.1981.

VANZELA A. L. L.; GUERRA M.; LUCEÑO M. *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae), a species with the lowest number of holocentric chromosomes ($n = 2$). *Cytobios* 88 p.219-228. 1996.

VANZELA A. L. L.; CUADRADO A.; JOUVE N.; LUCENO M.; GUERRA M. Multiple locations of the rDNA in species of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Chrom Res* 6 p.345-349. 1998.

VANZELA A. L. L.; LUCENO M.; GUERRA M. Karyotype evolution and cytotaxonomy in Brazilian species of *Rhynchospora* Vahl (Cyperaceae). *Bot Jour Linn Soc* 134 p.557-566. 2000.

VANZELA A. L. L.; GUERRA M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genetics and Molecular Biology.* 23 p.453-456. 2000.

VANZELA A. L. L.; COLAÇO W. Mitotic and meiotic behavior of γ irradiated holocentric chromosomes of *Rhynchospora pubera* (Cyperaceae). *Acta Scientiarum*. 2 p.611-614. 2002.

VANZELA A. L. L.; CUADRADO A. GUERRA M. Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genet Mol Biol* 26 p.199-201. 2003.

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

SCHARADER F. Notes on the mitotic behavior of long chromosomes. *Cytologia* 6 p.422-430. 1935.

SCHWARZACHER T. P.; Ambros P.; Schweizer D. Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis. *Pl Syst Evol* 134 p.293-297. 1980.

SHARMA A. K.; BAL A. K. A cytological investigation on some of the Indian members of the family Cyperaceae. *Proc. Indian Sci. Congr. Assoc.* 41 p.147. 1954.

SHEIKH S. A.; KONDO K.; HOSHI Y. Study on Diffused Centromeric Nature of *Drosera* Chromosomes, *Cytologia* 60 p.43-47. 1995.

SHEIK H.; KONDO K. Differential staining with orcein, giemsa CMA, and DAPI for comparative chromosome study of 12 species of Australian *Drosera* (Droseraceae). *Am. J. Bot.* 82 p.1278-1286. 1995.

SPJUT R. W. A systematic treatment of tupes fruit. *Memoirs of the new York Botanical Gardens*. Vol 70. 1994.

STEDJE B. A new low chromosome number for *Ornithogalum tenuifolium* (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* 161 p.65-69. 1988.

STEDJE B. Chromosome evolution within the *Ornithogalum tenuifolium* complex (Hyacinthaceae). *Pl. Syst. Evol.* 166 p.79-89. 1989.

STRANDHEDE S. O. Chromosome studies in *Eleocharis suber. Palustris*. I. Meiosis in some forms with 15 chromosomes. *Hereditas* 53 p.43-47. 1965.

SVENSON H. K. Contributions from the gray herbarium of Havard University. LXXXVI. Monographic studies in the genus *Eleocharis*. Rhodora. 31 p.121-245. 1929.

SVENSON H. K. Monographic studies in the genus *Eleocharis* II. Rhodora. 34 p.193-230. 1932.

SVENSON H. K. Monographic studies in the genus *Eleocharis* III. Rhodora. 36 p.377-408. 1934.

SVENSON H. K. Monographic studies in the genus *Eleocharis* IV. Rhodora. 39 p.219-279. 1937.

SVENSON H. K. Monographic studies in the genus *Eleocharis* V. Rhodora. 41 p. 1-110. 1939.

UENO O.; TAKEDA T. Photosynthetic, ecological characteristic, and the geographical distribution of the Cyperaceae in Japan. Oecologia 89 p.195-203. 1992.

WAHL H. A. Chromosome numbers and meiosis in the genus *Carex*. Am. J. Bot. 27 p.548-470. 1940.

WALTERS S. M. On the vegetative morphology of *Eleocharis* R. Br. New Phytology 49 (1) p.1- 7. 1950.

WESTERMAN M.; COLLET C. Interspersed distribution patterns of c-bands and satellite DNA in the holocentric chomosomes of *Luzula flaccida* (Juncaceae). Genetica 63 p.175-179. 1984.

YANO O.; KATSUYAMA T.; TSUBOTA H.; HOSHINO T. Molecular phylogeny of Japanese *Eleocharis* (Cyperaceae) based on ITS sequence data, and chromosomal evolution. J. Plant Res. 117 p.409-419. 2004.