

**LIDIANE DE LIMA FEITOZA**

**ALISMATALES *sensu stricto*: ANÁLISE CITOGENÉTICA  
COM TÉCNICA CONVENCIONAL, BANDEAMENTO  
E SÍTIOS DE DNAr 45S**

RECIFE-PE  
2008

**LIDIANE DE LIMA FEITOZA**

**ALISMATALES *sensu stricto*: ANÁLISE CITOGENÉTICA  
COM TÉCNICA CONVENCIONAL, BANDEAMENTO  
E SÍTIOS DE DNAr 45S**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientador: Dr. Reginaldo de Carvalho  
Co-orientador: Dr. Leonardo Pessoa Felix

RECIFE-PE  
2008

ALISMATALES *sensu stricto*: ANÁLISE CITOGENÉTICA COM TÉCNICA  
CONVENCIONAL, BANDEAMENTO E SÍTIOS DE DNAr 45S

LIDIANE DE LIMA FEITOZA

Orientador:

---

**Dr. Reginaldo de Carvalho**  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, PE)

Co-Orientador:

---

**Dr. Leonardo Pessoa Felix**  
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB, PB)

Dissertação submetida e aprovada pela banca examinadora:

---

**Dr<sup>a</sup>. Ana Emília Barros e Silva**  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, PE)  
Titular

---

**Dr<sup>a</sup>. Andrea Pedrosa Harand**  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, PE)  
Titular

---

**Dr<sup>a</sup>. Margareth Ferreira de Sales**  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, PE)  
Titular

Aos meus pais,  
**Luiz Alves Feitoza** (*in memoriam*) e **Noêmia Sales Lima Feitoza**  
e aos meus queridos irmãos.

---

**Dedico**

Para meus sobrinhos

**Ofereço**

**Agradeço...**

Ao meu **Senhor Jesus Cristo**

pela sua infinita bondade e misericórdia, e porque mesmo sem eu merecer me ama e permanece fiel a mim.

### **As instituições**

Programa de Pós-Graduação em Botânica por proporcionar minha qualificação profissional com o título de mestre.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos sem atraso.

Ao Laboratório de Genética-Bioquímica e Sequenciamento de DNA pelos equipamentos e espaço físico onde realizei minha pesquisa.

Aos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal (Ana Benko-Iseppon) e Citogenética Vegetal (Marcelo Guerra) da UFPE pelos usos dos Fotomicroscópios de epifluorescência.

### **Aos orientadores**

Dr. Reginaldo Carvalho, por me ensinar a pesquisar com seriedade, segurança e entusiasmo, por ser tão amigo, prestativo, gentil e acima de tudo, ético e humilde. "O professor se liga à eternidade; ele nunca sabe onde cessa sua influência". Henry Adams

Dr. Leonardo Pessoa Felix, pelo meu primeiro contato com a tão fascinante citogenética, por sempre discutir e melhorar nossos trabalhos e, principalmente, confiar em mim. Por me presentear com esse grupo lindo, que é Alismatales. Adorei!

### **Aos eternos mestres**

Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes por ter acreditado em mim desde o primeiro momento direcionando meus estudos, pelas oportunidades de estágios, monitorias e projetos, e principalmente pelo presente divino da sua amizade.

Dr. Antonio Alberto Jorge Farias Castro pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisas nos Cerrados Marginais do Nordeste, e através do PELD patrocinar minha viagem de coleta no Piauí.

Dra. Suzene Izídio pelas dicas em quimiosistemática, amizade, palavras de consolo nos momentos difíceis e orações.

Dr. Ulysses Paulino de Albuquerque, coordenador desse programa, pela sua dedicação e incentivo quando mais precisei.

### **À minha família**

Meu pai (*in memoriam*), por me mostrar o caminho do bem e da sensibilidade. Pelo seu exemplo de firmeza, mesmo nos últimos momentos.

Minha Mãe, pela vida e cultivar em mim sentimentos como a dignidade.

Meus irmãos Antônio Carlos, Edmar, Apolinário, Luiz Filho, Salvador, Francisco Lima, Jurandi, Cícero e Wilson, pelo apoio e confiança total, e às minhas irmãs Rita, Dora e Claudênia, por terem me dado o melhor de si, e por construir os alicerces da minha educação. Este título é verdadeiramente nosso!

### **Aos amigos**

Nouga Cardoso Batista, por fazer meu plano B tão bem realizado.

Seu Manasses e Dona Margarida por serem tão bons com a minha pessoa.

Do PPGB: Milena, Eric, Manoel Messias, Márcio, Ernani, Juarez, Íris, Danilo, Eduardo, Kleber, Ênio e Juliana, pela convivência agradável desde o dia da entrevista.

À turma da "BIOMETRIA": Rose, Moacy, Luiz José, Luiz Henrique, Lucas e Esdras que mesmo sendo de outra área, compartilharam comigo os mesmos ideais.

À turma do "GENOMA" nas pessoas do Cláudio (Dr.), Bel, Jack e Bené.

À Lidinalva, Maria e Clarisse por terem me apoiado na seleção.

À Normanda (esposa do Léo), Socorro Viana, Marlene Mata e Sílvia Pitrez por todo o apoio dado a mim em Areia-PB.

À minha eterna amiga piauiense Celisângela, por sempre fazer tudo por mim.

À minha amiga-irmã Rosângela (paraibana), pela nossa amizade verdadeira, pela partilha em tudo e pelas nossas sessões de psicanálise nesses anos.

À Iradênia, pessoa honesta, por ter me ajudado muito quando aqui chegamos.

À Lucineide (baiana), pela convivência agradável e experiências compartilhadas.

Às vizinhas (601, 602 e 603), Ângela, Dona Luzinete e Dona Ivone. É minha família "nesta terra".

E por fim, mas não por último, ao meu namorado-anjo Eroni, por sua existência e por me tornar um ser humano melhor. Por tudo que tem sido na minha vida!

Para todos que contribuíram, da sua forma, para eu chegar até aqui. Muito obrigada!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	16
2.1 CITOTAXONOMIA DA ORDEM ALISMATALES COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS ALISMATACEAE, HYDROCHARITACEAE E LIMNOCHARITACEAE	16
2.1.1 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS DA ORDEM ALISMATALES	16
2.1.2 FAMÍLIA ALISMATACEAE	17
2.1.3 FAMÍLIA HYDROCHARITACEAE	20
2.1.4 FAMÍLIA LIMNOCHARITACEAE	22
2.2 PRINCIPAIS TÉCNICAS E CONTRIBUIÇÃO DA CITOGENÉTICA EM ESTUDOS CITOTAXONÔMICOS	24
2.2.1 ANÁLISE CONVENCIONAL	24
2.2.2 HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA HC	25
2.2.3 BANDEAMENTO COM OS FLUOROCROMOS CMA/DAPI	28
2.2.4 MARCAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DOS NUCLÉOLOS (RONS) COM NITRATO DE PRATA	30
2.2.5 FISH (FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)	32
<b>3. REFERÊNCIAS</b>	34

**CAPÍTULO I –** Citogenética de Alismatales ss: evolução cromossômica e bandeamento C

Resumo 42

Palavras chave	42
Introdução	43
Materiais e Métodos	44
Resultados	45
Discussão	47
Agradecimentos	50
Referências Bibliográficas	54

**CAPITULO II – Citogenética de Alismataceae e Limnocharitaceae: bandeamento CMA/DAPI e FISH do DNAr 45S**

Resumo	58
Palavras chave	58
Introdução	59
Materiais e Métodos	60
Resultados	62
Discussão	64
Agradecimentos	68
Referências Bibliográficas	72

**4. CONCLUSÕES** 74

ANEXOS

NORMAS DA REVISTA PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION	76
NORMAS DA REVISTA GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY	78

LISTA DE TABELAS

---

## CAPITULO I

**Tabela 1.** Relação das espécies estudadas de Alismatales, material estudado, proveniência, números cromossômicos observados, contagens prévias, fórmula cariotípica e distribuição da heterocromatina. **2n**: número cromossômico somático, **Fig**: Figuras; **FC**: Fórmula Cariotípica; **MMMC**: Média do menor e do maior cromossomo, **DH**: Distribuição da Heterocromatina (**bpa**: bloco proximal amplificado; **bpp**: bloco proximal pequeno; **bpd**: bloco proximal distendido; **btt**: bloco terminal telomérico) 51

## CAPITULO II

**Tabela 1.** Relação de espécies pertencentes às Famílias Alismataceae, Limnocharitaceae e Hydrocharitaceae (Alismatales) e dados obtidos. Abrev.: **FC**: Fórmula Cariotípica; **CMA/DAPI**: heterocromatina visualizada por fluorocromos; **C/CMA/DAPI**: heterocromatina detectada com bandeamento C e corada sequencialmente com os fluorocromos **CMA/DAPI** 68

---

## CAPITULO I

**Fig. 1** - Coloração com Giemsa em espécies de Alismatales (incluindo bandeamento C para os *Echinodorus* analisados). *E. paniculatus* (a, b); *E. grandiflorus* (c, d). *E. andrieuxii* (e, f); *E. lanceolatus* (g, h); *E. tenellus* (i, j); *Hydrocleys nymphoides* (l); *H. martii* (m); *L. flava* (n); *L. laforestii* (o); *Limnobium laevigatum* (p). Em b, c, d cabeças de setas indicam satélite pequeno e em h indica satélite amplificado. Setas indicam satélites correspondentes as RONS heterocromáticas evidenciadas pelo bandeamento C. Bar = 10 µm

52

**Fig. 2** - Idiograma de algumas espécies de Alismatales. a) *Echinodorus paniculatus* (n=11), b) *E. andrieuxii* (n=11), c) *E.lanceolatus* (n=11), d) *E. grandiflorus*, e) *E. tenellus* (n=11), f) *Limnobium laevigatum* (n=14), g) *Limnocharis flava* (n=10), h) *L. laforestii* (n=10), i) *Hydrocleys nymphoides* (n=8) e j) *H. martii* (n=8). a, c, d e e mostram pares heteromórficos para distensão das RONS heterocromáticas visualizadas pelo bandeamento C. No quadro, representação esquemática da hipótese em que *E. lanceolatus* (l) e *E. longipetalus* (m) originaram o possível híbrido *E. macrophyllus* (n)

53

## CAPITULO II

**Figura 1** - Idiograma das espécies de Alismatales. **a)** *Echinodorus paniculatus*, **b)** *E. andrieuxii*, **c)** *E. lanceolatus*, **d)** *Limnocharis flava*, **e)** *L. laforestii*, **f)** *Hydrocleys nymphoides* e **g)** *H. martii*; **a, b, c**, n=11 e barra horizontal mostrando o par heteromórfico para distensão da RON; **d e e**, n=10; **f e g**, n=8. 69

**Figura 2** - Coloração CMA/DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e DNAr 45S em espécies do gênero *Echinodorus* (2n=22). *E. paniculatus*, **A)** DAPI, **B)** CMA, **C)** sítios de DNAr 45S; *E. lanceolatus*, **D e E)** C/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>, **F)** sítios de DNAr 45S e bandas DAPI<sup>+</sup>; *E. tenellus*, **G)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, **H)** sítios de DNAr 45S; *E. grandiflorus*, **I)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, **J)** sítios de DNAr 45S; *E. andrieuxii*, **L)** C/CMA/DAPI e **M)** sinais de DNAr 45S. Setas da mesma cor nas fotos de CMA indicam pares homólogos; setas vermelhas em **E** indicam 14 blocos terminais DAPI<sup>+</sup>. Sinais em verde representam sonda marcada com digoxigenina/FITC (**C, H e J**), sinais em vermelho representam sonda marcada com biotina/TRITC (**F e M**). Barra em **M** equivale a 10µm. ....70

**Figura 3** Coloração com CMA/DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e FISH em espécies de *Limnocharis* com 2n=20 e *Hydrocleys* com 2n=16. *Limnocharis flava*. **A e B)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>; **C)** sítios de DNAr 45S; *L. laforestii*, **D e E)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>, **F)** C/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>(imagens sobrepostas); *Hydrocleys martii*. **G e H)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>; **I)** DNAr 45S; *Hydrocleys nymphoides*. **J e L)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> e **M)** dois sítios de DNAr 45S. Setas indicam bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr 45S. Barra em **M** corresponde a 10µm. 71

RESUMO

---

A ordem Alismatales corresponde a um dos cladogramas basais de monocotiledôneas e se apresenta predominantemente em habitats aquático ou semi-aquático. Nesse trabalho, objetivou-se compreender as relações taxonômicas internas e a evolução cariotípica em um grupo de Alismatales de ocorrência exclusivamente neotropical. Para isso, foram realizados estudos citogenéticos em cinco espécies de Alismataceae e quatro de Limnocharitaceae baseados na coloração convencional com uso de Giemsa 2%, marcação das RONS com nitrato de prata, bandeamento cromossômico C, dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI e hibridização *in situ* fluorescence (FISH) com sondas de DNA ribossomal 45S. Em Hydrocharitaceae, foi usada apenas a coloração convencional com Giemsa 2%. Na família Alismataceae, as espécies de *Echinodorus* apresentaram  $2n=22$  e padrão de bandas CMA/DAPI e C/CMA/DAPI localizadas na região do braço curto e satélite de dois dos menores pares acrocêntricos. A hibridização *in situ* com sondas de DNAr 45S coincidiu em geral, com os blocos observados com uso dos fluorocromos, com exceção de *E. andrieuxii* que obteve apenas três sítios. *E. lanceolatus* foi a única espécie que apresentou bandas DAPI<sup>+</sup>, localizadas nas regiões teloméricas de sete pares acrocêntricos. Em Limnocharitaceae, as regiões marcadas pelos fluorocromos CMA/DAPI e bandeamento C/CMA<sup>+</sup> corresponderam às RONS e aos dois sítios de DNAr 45S em *Hydrocleys nymphoides* ( $2n=16$ ) e aos quatro em *Limnocharis flava* ( $2n=20$ ). Entretanto, *L. laforestii* diferiu em relação aos sítios de DNAr 45S, que foram apenas dois. As espécies *Hydrocleys nymphoides* e *H. martii* tiveram a posição da heterocromatina rica em GC associada ao satélite localizada em um par acrocêntrico pequeno na primeira, e em um par metacêntrico de tamanho intermediário, na segunda. O único representante de Hydrocharitaceae, *Limnobium laevigatum*, obteve  $2n=28$  e cariótipo assimétrico do tipo bimodal, assim como as demais espécies. Nesse grupo analisado, técnicas citogenéticas mais refinadas detectaram alterações cromossômicas estruturais importantes para a evolução cariotípica em Alismatales.

Feitoza, Lidiane de Lima; M.Sc; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro, 2008; **ALISMATALES *sensu stricto*: CYTOGENETICS ANALYSIS WITH CONVENTIONAL TECHNIQUES, BANDING AND 45S rDNA SITES**; Reginaldo de Carvalho e Leonardo Pessoa Felix.

ABSTRACT

---

The order Alismatales corresponds to one of the basal monocotyledones clads and is found predominantly in habitats aquatic or semiaquatic. The present work aimed to understand the internal taxonomic relations and the karyotype evolution in a monophyletic group of Alismatales of exclusively neotropical occurrence. Five species of Alismataceae and four of Limnocharitaceae were investigated using 2% Giemsa, silver nitrate staining, C-banding, CMA/DAPI fluorochromes staining and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with probes of ribosomal 45S DNA. One species of Hydrocharitaceae was also staining with Giemsa 2%. In Alismataceae, the *Echinodorus* species showed  $2n=22$  and CMA/DAPI and C/CMA/DAPI bands located in the short arm and satellite of two of the smallest acrocentric chromosomes pairs. Fluorescence *in situ* hybridization with 45S rDNA probe co-localized in general, with the blocks revealed after fluorochromes staining, with exception of *E. andrieuxii*, for which only three 45S rDNA sites were detected. *E. lanceolatus* was the only species with DAPI+ bands, which were located in the telomeric regions of seven acrocentric pairs. In Limnocharitaceae, *Hydrocleys* ( $2n=16$ ) and *Limnocharis* ( $2n=20$ ), the CMA<sup>+</sup> regions had corresponded to the RONS and the 45S rDNA sites in *Hydrocleys nymphoides* and *Limnocharis flava*. *L. laforestii* differed in relation to the number of 45S rDNA because two sites were observed in the later. In *Hydrocleys nymphoides* and *H. martii* the GC-rich in the heterochromatin was associated with the satellite located in the smallest acrocentric pair, and in a metacentric pair of intermediate size in the later. The only representative of Hydrocharitaceae, *Limnobium laevigatum* showed  $2n=28$  and an asymmetric bimodal karyotype as well as the other investigated species. In the group examined the refined techniques cytogenetic provided information such as detection of structural chromosome changes important for the karyotype evolution in Alismatales.

## 1. INTRODUÇÃO

A ordem Alismatales compreende um grupo de plantas de hábitat predominantemente aquático ou semi-aquático e de delimitação taxonômica controversa, mesmo em relação aos sistemas filogenéticos mais recentes. Para o sistema APG I (1998) e Judd et al. (1999) a ordem seria formada por 13 famílias de plantas aquáticas, enquanto para o APG II (2003), Alismatales é ampliada pela inclusão da família Araceae. De acordo com este último sistema a ordem passou a abranger um total de 14 famílias, 166 gêneros e 4490 espécies, metade destas, pertencentes à família Araceae.

Conflitos taxonômicos relacionados a este grupo de plantas são conhecidos, e alguns são historicamente relatados. Inicialmente, Dahlgren e Clifford (1981) estabeleceram que a ordem Alismatales era formada por apenas uma família, Alismataceae, que incluía espécies anteriormente pertencentes à Limnocharitaceae. Posteriormente, Dahlgren et al., (1985) baseados em dados morfológicos incluíram nesta ordem mais quatro famílias: Aponogetonaceae, Butomaceae, Hydrocharitaceae e Limnocharitaceae. Em seguida, Cronquist (1998) separou Hydrocharitaceae, ficando esta família, como a única representante da ordem Hydrocharitales e a ordem Alismatales reduzida a quatro famílias no total.

Segundo APG I (1998) e Judd et al. (1999), a inclusão de Limnocharitaceae em Alismataceae é suportada por diversas características morfológicas tais como presença de laticíferos, flores hipóginas, três ou mais carpelos, um ou mais óvulos e sementes com embrião curvado. Ao contrário, Tomlinson (1982) já afirmava existir diferenças marcantes nessas duas famílias, entre elas, placentação basal e fruto indeiscente nas Alismataceae e placentação parietal e fruto deiscente nas Limnocharitaceae. Atualmente, dados moleculares concordam com este último autor em considerar as Alismataceae e Limnocharitaceae famílias distintas, formando um clado monofilético juntamente com as Hydrocharitaceae e Butomaceae (JANSSEN e BREMER, 2004).

A citogenética estuda o cromossomo, tanto no que diz respeito à sua morfologia, variação e evolução. O uso de dados citogenéticos na sistemática vegetal vem sendo considerado importante para a compreensão das relações de parentesco, tanto dentro de pequenos táxons como subespécies, espécies e gêneros, quanto em níveis superiores como famílias e divisões (STEBBINS, 1971).

Nessa área, as técnicas de bandeamento permitem corar diferencialmente regiões cromossômicas formadas por bandas heterocromáticas. Dentre estas, o

bandeamento C revela a heterocromatina constitutiva, enquanto os corantes fluorescentes indicam sua constituição em termos de pares de base GC (como por exemplo a cromomicina A<sub>3</sub> - CMA) e AT (4', 6' - diamidino-2-fenilindol - DAPI), entre outros (revisado por Guerra, 2000). Outra técnica importante em citogenética é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), que localiza um determinado gene através de sondas específicas (BENNETT e LEITCH, 1995; GUERRA, 2004).

Do ponto de vista citogenético, existem poucas informações sobre os cromossomos das espécies de Alismatales, especialmente se excluirmos os trabalhos abordando a família Araceae. De maneira geral, dados cariológicos reportados para a ordem Alismatales *sensu stricto* são restritos ao número e morfologia cromossômica com uso de técnicas convencionais (trabalhos realizados por LOHAMAR, 1931; OLESON, 1941; BALDWIN e SPEESE, 1955; BERNADELLO e MOSCONE, 1986; COSTA e FORNI-MARTINS, 2003), sendo raros os registros onde são empregadas técnicas de bandeamento e hibridização *in situ*. São conhecidos apenas os trabalhos de Kenton (1981) com bandeamento C em *Hydrocleys nymphoides*, Costa e Forni-Martins (2004) com bandeamento C em *Echinodorus tenellus* e Costa et al. (2006), bandeamento C, fluorocromos e FISH em algumas espécies de *Echinodorus*. Até então, não eram conhecidos dados cariológicos para espécies de Alismatales *sensu stricto* do Nordeste do Brasil.

O presente trabalho aborda aspectos citológicos de quatro gêneros e nove espécies de Alismatales do Nordeste do Brasil. Adicionalmente foi incluída uma espécie de *Echinodorus* proveniente do estado do Rio Grande do Sul. Foram empregadas técnicas de coloração convencional com Giemsa, bandeamento C-Giemsa, coloração com nitrato de prata, bandeamento C-CMA/DAPI, coloração direta CMA/DAPI e hibridização *in situ* utilizando-se sondas do DNAr 45S, com o objetivo de caracterizar os cariótipos e ampliar o conhecimento citogenético nesse grupo de plantas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 CITOTAXONOMIA DA ORDEM ALISMATALES COM ÊNFASE NAS FAMÍLIAS ALISMATACEAE, HYDROCHARITACEAE E LIMNOCHARITACEAE**

#### **2.1.1 CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS DA ORDEM ALISMATALES**

A ordem Alismatales compreende atualmente 4490 espécies de hábitat predominantemente aquático ou semi-aquático. Está distribuída em 166 gêneros e 14 famílias de acordo com APG II (2003). É considerada um dos grupos basais entre as monocotiledôneas (CRONQUIST, 1988), apresentando relações de proximidade com a ordem Nymphaeales, possivelmente descendentes de um ancestral comum. No entanto, Dahlgren e Clifford (1982) sugeriram que caracteres primitivos como numerosos estames e ovário dialicarpelar, compartilhados por indivíduos de ambas as ordens, dando uma impressão de similaridade entre suas espécies, seriam na realidade caracteres derivados que resultaram de uma adaptação paralela ao habitat aquático.

Em Alismatales, duas famílias proximamente relacionadas, Alismataceae e Limnocharitaceae se diferenciam de Aponogetonaceae, Butomaceae e Hydrocharitaceae, também pertencentes a ordem, numa série de caracteres como látex e embrião fortemente curvado (DAHLGREN et al., 1985). Durante muito tempo a família Limnocharitaceae foi considerada como parte da família Butomaceae (RAO, 1953), embora Chatin (1856) houvesse percebido que muitas espécies de Limnocharitaceae apresentavam caracteres morfológicos mais semelhantes às Alismataceae do que às Butomaceae.

Dahlgren e Clifford (1981), baseados principalmente na morfologia, sugeriram que a ordem Alismatales deveria ser composta por apenas uma família, Alismataceae, a qual incluía as espécies outrora pertencentes às Limnocharitaceae. A classificação das famílias neotropicais de Alismatales foi notavelmente semelhante nas concepções de Cronquist (1981) e Dahlgren e Clifford (1982), diferindo apenas quanto à separação de Alismataceae e Limnocharitaceae. Dahlgren e Bremer (1985) voltaram a reconhecer Limnocharitaceae como família distinta de Alismataceae e incluíram em Alismatales não só Limnocharitaceae como também mais três famílias distintas: Aponogetonaceae, Butomaceae e Hydrocharitaceae. Três anos depois, Cronquist (1988) retirou de Alismatales a família Hydrocharitaceae, colocando-a na ordem Hydrocharitales, e transferiu Aponogetonaceae para a ordem Najadales, que ficou composta por mais dez

famílias, entre elas Potamogetonaceae e Zosteraceae. Restaram para a ordem Alismatales três famílias: Alismataceae, Butomaceae e Limnocharitaceae. Mais recentemente, Judd et al. (1999), utilizando seqüência de DNA do gene *rbcL* em sua análise filogenética molecular, propuseram dois grandes clados dentro de Alismatales. O primeiro formado por cinco famílias: Alismataceae e Limnocharitaceae, intimamente relacionadas, Butomaceae, Hydrocharitaceae e Najadaceae. No segundo clado encontram-se as famílias Scheuchzeriaceae, Aponogetonaceae, Juncaginaceae, Cymodoceaceae, Posidoniaceae e Ruppiaceae entre outras, totalizando 13 famílias. Essa análise resultou em uma nova mudança taxonômica em Alismatales, de forma que, Limnocharitaceae voltou a ser incluída em Alismatales como já havia estabelecido Dahlgren e Clifford (1981) e Les et al. (1997). Atualmente a inclusão de Limnocharitaceae em Alismataceae tem sido suportada por análise filogenética molecular (JANSSEN e BREMER, 2004; CHEN et al., 2004; TAMURA et al., 2004) e apesar de proximamente relacionadas, permanecem como famílias distintas para muitos pesquisadores (APG II, 2003). Essa inclusão também tem sido apoiada por análises morfológica e citogenética (CRONQUIST, 1988; COSTA e FORNI-MARTINS, 2003).

### 2.1.2 - FAMÍLIA ALISMATACEAE

Alismataceae Vent. compreende um grupo de plantas aquáticas e semi-aquáticas, rizomatosas, folhas aéreas ou submersas com presença de laticíferos, ovário súpero, placentação basal e frutos do tipo aquênio (HAYNES e HOLM-NIELSEN, 1994), ocorrendo dos EUA até a Argentina e adjacências. As flores de cor branca são perfeitas ou imperfeitas, como no gênero *Sagittaria* (HAYNES e HOLM-NIELSEN, 1994). A espécie mais comumente encontrada no Brasil é *Echinodorus grandiflorus* Mich., descrita por Correa Junior et al. (1994) como erva aquática de caule triangular e glabro, folhas longamente pecioladas, ovadas a cordiformes de consistência coriácea, grandes, eretas e flutuantes.

Dados imprecisos quanto ao posicionamento taxonômico de alguns gêneros têm sido observados na família. Cronquist (1988), baseado em dados dos verticilos florais, lâmina foliar e órgãos reprodutivos, considerou para a família 11 gêneros e 75 espécies. Haynes e Holm-Nielsen (1994) relataram a presença de 13 gêneros e 75 espécies, o que foi apoiado por Soro e Les (2002). Quando Judd et al. (1999), baseados principalmente em dados moleculares, incorporaram em

Alismataceae alguns gêneros anteriormente pertencentes às Limnocharitaceae, a família passou então a ser representada por 16 gêneros e 100 espécies, inclusão esta, aceita até os dias de hoje. No Brasil, o gênero conta com 45 espécies (COSTA et al., 2006), 17 destas ocorrentes principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste. Seis são distribuídas naturalmente na região Sudeste, *E. aschersonianus* Graebn., *E. longipetalus* Mich., *E. grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli, *E. macrophyllus* (Kunth) Micheli, *E. paniculatus* Micheli e *E. tenellus* (Mart.) Buchenau, e cinco na região Nordeste, *E. grandiflorus* subsp. *grandiflorus* (Cham. & Schltld.), *E. paniculatus* (Mich.), *E. andrieuxii* (Hook & Arnott), *E. lanceolatus* (Rataj, Bull.) e *E. tenellus* (Mart) Buchenau.

*Echinodorus* é um dos gêneros mais representativos em Alismataceae (COSTA et al., 2006). Destaca-se por apresentar importância medicinal com a recente confirmação científica de atividade antiepiléptica (BUZNEGO E PÉREZ – SAAD, 2006). *Echinodorus macrophyllus* Kunth. ou *E. grandiflorus*, popularmente conhecidas como Chapéu-de-couro apresentam propriedades anti-reumáticas (KOBAYASHI et al., 2002).

Variações na composição específica do gênero têm sido relatadas em estudo morfológico realizado por Micheli em 1881. Rataj (e.g. RATAJ, 1975; 1978 e 2004) também detalhou estudo morfológico para o gênero e acrescentou informações fornecidas por Fasset's (1955), que tinha dividido o gênero em 11 secções e reconheceu 47 espécies de *Echinodorus*, classificação esta, admitida por Cook (1978). Para Haynes e Holm-Nielsen (1994), o gênero era composto por apenas 26 espécies, excluindo-se gêneros outrora pertencentes às Limnocharitaceae.

A utilização da citogenética na taxonomia vegetal vem sendo feita desde o início do século passado e é considerada instrumento importante para a compreensão das relações de parentesco e dos mecanismos de evolução das espécies. Caracteres citológicos, tais como número e morfologia dos cromossomos mitóticos e comportamento cromossômico meiótico podem contribuir para o conhecimento da evolução e das relações entre diferentes populações e espécies (Guerra, 1990). Costa et al. (2006) avaliaram número e morfologia cromossômica em cinco espécies de *Echinodorus* (Alismataceae) com aplicação de técnicas de bandeamento cromossômico específicas, sendo essa, a análise citogenética mais aprofundada para o grupo. Os cariótipos de *Echinodorus bolivianus*, *E. grandiflorus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus* e *E. tenellus* (Alismataceae) foram estudados através do bandeamento C, fluorocromos CMA e

DAPI e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNAr 45S. Todas as espécies apresentaram número cromossômico  $2n=22$  e cariótipo fortemente bimodal pela presença de um par metacêntrico e o restante acrocêntrico. No cariótipo foi observada baixa quantidade de heterocromatina, além de heteromorfismo para distensão da RON em pelo menos um par cromossômico. Também foi observada pouca variação nas regiões ricas em GC nas cinco espécies, embora algumas diferenças tenham sido vistas no número e posição das bandas C nas regiões ricas em AT e sítios de DNAr 45S. *E. bolivianus* e *E. tenellus* foram citologicamente bastante parecidas, corroborando a sinonímia sugerida anteriormente por Jérémie et al.(2001) (ver COSTA et al., 2006).

Um exemplo da importância da citogenética em estudos taxonômicos na família Alismataceae foi a localização de uma população triplóide de *Echinodorus tenellus* com uso dos fluorocromos CMA (cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI (4'-6 diamidino, 2-phenilindole), onde os espécimes da população de Itapetininga (SP) tiveram número cromossômico  $2n=22$  e os espécimes de Itirapina (SP)  $2n=33$  (COSTA e FORNI-MARTINS, 2004). Esses fluorocromos marcaram regiões de DNA ricas em G/C e A/T simultaneamente em dois cromossomos homólogos na população triplóide, permitindo concluir o surgimento desse triplóide através de autopoliploidia. Sabendo-se que a poliploidia é um dos eventos responsáveis pelos processos de especiação (STEBBINS, 1950; GRANT, 1981; SOLTIS e SOLTIS, 1999; 2000), os autores acreditam que o espécime de Itirapina com  $2n=33$  poderá ser reconhecida como uma nova espécie. Esse foi o primeiro relato de ocorrência de poliplóides em espécies neotropicais de *Echinodorus*. Uma série aneuplóide foi previamente relatada por Harada (1956) para *Alisma lanceolata* ( $2n = 26$  e  $28$ ), *A. plantago* L., ( $2n = 10, 12$  e  $14$ ) e para *Echinodorus ranunculoides* Engelm. ( $2n = 14, 16$  e  $18$ ). De acordo com Haynes e Burkhalter (1998) e Padgett (2003), mesmo diante de estudos taxonômicos e citogenéticos realizados em *Echinodorus*, o gênero ainda é pouco compreendido em sua origem taxonômica e número de espécies. A escassez de estudos citotaxonômicos talvez justifique a forte semelhança encontrada entre seus táxons, uma vez que os problemas taxonômicos referentes à *Echinodorus* sejam devido sobre tudo à extrema semelhança morfológica entre suas espécies. Além disso, a semelhança dos seus habitats juntamente com a constância do número e morfologia cromossômica são fatores que proporcionam condições de hibridização interespecífica, o que dificulta ainda mais a delimitação das espécies.

### 2.1.3 - FAMÍLIA HYDROCHARITACEAE

Hydrocharitaceae A. L. Juss., apresenta espécies de hábitat aquático, anuais ou perenes, folhas emersas ou submersas, ovário ínfero e placentação laminar ou parietal, sendo este último um dos caracteres morfológicos que a distingue da família Alismataceae. Consiste de 16 gêneros e cerca de 100 espécies. Em Alismatidae, é única em apresentar carpelos unidos e ovário ínfero (JANSSEN e BREMER, 2004). Oito dos seus gêneros ocorrem nos Neotrópicos, entre eles: *Limnobium* e *Egeria*. Os gêneros *Halophila* e *Thalassia* são espermatófitas marinhas. No passado, essa família foi relacionada com Butomaceae por apresentar características comuns tais como placentação laminar e ausência de ductos laticíferos (HAYNES e HOLM-NIELSEN, 1989).

Plantas aquáticas em geral apresentam muitos problemas para a taxonomia devido à presença de estruturas reprodutivas freqüentemente reduzidas, extensa plasticidade fenotípica e características morfológicas convergentes (SCULTHORPE, 1967; SOROS e LES, 2002). Embora estudos da plasticidade fenotípica tenham sido realizados ao longo da história das plantas (SCHLICHTING 1986; SCHEINER 1993; SCHLICHTING e PIGLIUCCI 1998), a extensão em que o padrão da plasticidade ocorre e a base adaptativa desta variação são questões não resolvidas. Muitas aquáticas ocorrem nos habitats caracterizados por gradientes ambientais severos e frequentemente mostram respostas dramáticas em seus traços vegetativos a mudanças nos níveis da água.

Em Alismatales, estudos de plasticidade fenotípica foram realizados recentemente para o gênero *Sagittaria*. Vamosi e Otto (2002) constataram que as espécies *Sagittaria falcata*, *S. lancifolia*, *S. platyphylla*, *S. rigida*, *S. isoetiformis* e *S. papillosa*, desenvolvidas em solo submerso a 4, 5, 12, 19,5 e 27 cm, apresentaram redução gradativa na largura e no comprimento das folhas e aumento no comprimento do pecíolo de acordo com a profundidade, em centímetros. Tais respostas plásticas em estruturas vegetativas promovem a sobrevivência e a propagação nos ambientes heterogêneos típicos de muitos habitats úmidos (BARRETT, 1993). O significado ecológico e evolucionário da variação da forma foliar representa um exemplo clássico de plasticidade (ARBER 1920; SCULTHORPE 1967).

Estudos citotaxonômicos têm ajudado a entender processos de evolução em Hydrocharitaceae, porém diante do grande número de espécies apresentando

delimitação taxonômica controversa, observa-se carência de estudos que possam melhor esclarecer as questões evolutivas e taxonômicas envolvendo este grupo, uma vez que a citogenética dispõe de técnicas capazes de acrescentar informações importantes no entendimento dessas relações. Alguns trabalhos citogenéticos com o uso de técnicas convencionais podem ser citados. Um dos tratamentos citogenéticos pioneiros na ordem Alismatales foi realizado por Bernadello e Moscone (1985) em Hydrocharitaceae, na espécie *Limnobium spongia* (Bosc) Steudel, uma planta aquática endêmica dos EUA, comum nos estados de Nova York e Texas, ocorrendo também aos arredores do estado do Mississippi. Os autores observaram  $2n = 24$  cromossomos em células somáticas e um cariótipo composto por 5 pares metacêntricos, 3 submetacêntricos e 4 pares subtlocêntricos, correspondendo atualmente aos acrocêntricos, os quais apresentam satélites nos pares 3 e 11. Os resultados foram comparados posteriormente por Moscone e Bernadello (1986) com o gênero *Hydromystria* e confirmaram o ponto de vista dos que consideravam a relação genérica *Hydromystria* x *Limnobium*. Alguns autores consideravam essas espécies como entidades distintas (EICHLER, 1875; ASCHERSON e GURKE, 1889) enquanto outros incluíam *Hydromystria* em *Limnobium* (ENDLICHER, 1837; BENTHAM e HOOKER 1883; DANDY 1959).

Hydrocharitaceae apresenta uma variedade de números cromossômicos desde  $2n=16$  a  $2n=72$  (HARADA, 1956), com tamanhos entre 1,6 a 10,0  $\mu\text{m}$ , acompanhado de uma gradual mudança nos comprimentos cromossômicos relacionados à distribuição geográfica na maioria de suas espécies (SHARMA e CHATTERJEE, 1967). Seu padrão cariotípico é similar ao de Alismataceae, especialmente no comprimento e morfologia cromossômica, o que poderia justificar a relação proposta nesse grupo por Judd et al. (1999).

Tanaka et al. (1997), baseados na análise dos genes *rbcl* e *matB*, sugeriram uma série de características relacionadas entre gêneros pertencentes à família Hydrocharitaceae. Nesse trabalho, os autores demonstraram que *Najas* está pouco associado com *Hydrilla* ( $2n=16, 24$ ) e *Vallisneria* ( $2n=22, 24, 28, 30$  e  $40$ ). Para Les et al. (1997) *Hydrocharis* ( $2n=14, 16$ ), *Hydromystria* ( $2n=28$ ) e *Limnobium* ( $2n=24, 28$ ) são gêneros bem próximos. Para outros autores, o gênero *Lagarosiphon* ( $2n=22$ ) está fortemente ligado a *Egeria* ( $2n=46$ ), *Elodea* ( $2n=24, 46, 48$ ), *Blyxa* ( $2n=32$ ) e *Ottelia* ( $2n=22$  a  $68$ ) por suas características morfológicas basais.

#### 2.1.4 - FAMÍLIA LIMNOCHARITACEAE

Em Alismatales, a família Limnocharitaceae Takht. também abrange espécies com hábitat aquático, anuais ou perenes com folhas submersas ou aéreas, raízes rizomatosas, placentação laminar e fruto foliculoso adaxialmente deiscente, sendo as últimas características importantes para diferenciá-la das Alismataceae (TOMLINSON, 1982). Apresenta três gêneros, dois neotropicais (*Limnocharis* Humb. e Bomp. e *Hydrocleys* Rich). ocorrendo nos neotrópicos e *Butomopsis* Kunth. em regiões pantropicais. É considerada uma das mais primitivas entre as monocotiledôneas pela presença de carpelos e estames numerosos e placentação laminar (HAYNES e HOLM-NIELSEN, 1992). Espécies de Limnocharitaceae foram consideradas parte da família Butomaceae a qual passou a ser constituída por cinco gêneros: *Limnocharis*, *Hydrocleys*, *Butomopsis*, *Butomus* e *Ostenia* (RAO, 1953). Porém, a observação de características morfológicas tais como presença de laticíferos em indivíduos de Limnocharitaceae e ausência destes em Butomaceae deram suporte à separação das duas famílias. *Limnocharis*, *Hydrocleys* e *Butomopsis* são os representantes atuais de Limnocharitaceae.

Estudos de contagem e morfologia cromossômica em Limnocharitaceae foram feitos para algumas espécies incluindo *Limnocharis flava* ( $2n=20$ ), *Hydrocleys modesta* ( $2n=14$ ), *H. nymphoides* ( $2n=16$ ) e *Butomopsis (tenagocharis) latifolia* ( $2n=14$ ) (HARADA, 1956; LARSEN, 1963; SHARMA e CHATTERJEE, 1967; SUBRAMANIAN e KAMBLE, 1967; KENTON, 1981).

Kenton (1981) realizou o primeiro estudo envolvendo bandeamento para o gênero *Hydrocleys*. No trabalho, identificou pela primeira vez o cariótipo da espécie *Hydrocleys modesta* composto por  $2n=14$  cromossomos. Esse cariótipo foi muito similar ao observado anteriormente para *Butomopsis latifolia*, e quando comparado ao de *Hydrocleys nymphoides* ( $2n=16$ ) revelou uma relação evolutiva acompanhada das traslocações Robertsonianas. No pareamento meiótico foram observadas mais semelhanças, inclusive no padrão de bandas, sugerindo que *Hydrocleys modesta* surgiu por fusão cêntrica de dois cromossomos acrocêntricos originando um metacêntrico com perda do fragmento cêntrico, ou o

contrário, *H. nymphoides* sendo a espécie mais derivada, originada através de fissões cêntricas do tipo Robertsoniana.

Mais recentemente, Forni-Martins e Calligaris (2002) revisaram número e morfologia cromossômica apenas nos gêneros neotropicais, *Limnocharis* e *Hydrocleys*. O número cromossômico encontrado foi de  $2n = 20$  para *Limnocharis flava* e *L. laforestii* e  $2n = 16$  para *H. nymphoides*. Essa análise confirmou a contagem realizada por Kenton para o gênero *Hydrocleys*, embora tenha diferido mais com relação à posição do satélite e conseqüentemente no padrão de bandas C. Em todas as espécies, o comprimento cromossômico variou gradualmente e uma alta quantidade de cromatina foi encontrada na espécie *H. nymphoides* (comprimento total de cromatina (TCL) =  $58,6\mu\text{m}$ ) quando comparado com *L. flava* e *L. laforestii* (TCL =  $51,0$  e  $41,9\mu\text{m}$ , respectivamente). Cerca de 75% dos cromossomos foram acrocêntricos. Nesse grupo, a assimetria cariotípica é tida como um caráter derivado, e os autores acreditam que na família Limnocharitaceae a derivação no cariótipo pode ter sido acompanhada pelo aumento nos elementos reprodutivos, principalmente carpelos, estames e números cromossômicos.

A caracterização citogenética evidencia marcadores citológicos que permitem identificar alterações numéricas e estruturais. Em geral, estas alterações cromossômicas podem implicar em diferenças fenotípicas, sendo importantes no entendimento dos processos evolutivos. Assim, estudos citológicos comparativos entre *taxa* têm contribuído para entender processos filogenéticos, com ênfase na citotaxonomia (GUERRA, 1987). A análise cariotípica relacionada à avaliação do número, tamanho dos cromossomos, relação entre braços, número e posição das constrições secundárias, podem trazer informações importantes na análise comparativa entre táxons aparentados ou mesmo entre indivíduos da mesma espécie (GUERRA et al., 1997).

Em Alismatales de maneira geral, existem poucos estudos citotaxonomicos. Acredita-se que um tratamento citogenético utilizando técnicas mais refinadas diferente do que tem sido referido na literatura para estas espécies poderá fornecer informações importantes como detecção de alterações cromossômicas estruturais, via coloração diferencial, as quais poderão auxiliar nas questões taxonômicas controversas.

## 2.2 – PRINCIPAIS TÉCNICAS E CONTRIBUIÇÃO DA CITOGENÉTICA EM ESTUDOS CITOTAXONÔMICOS

### 2.2.1 ANÁLISE CONVENCIONAL

A utilização dos corantes acidófilos possibilitou uma visualização nítida dos cromossomos, revelando dados sobre o número e estrutura cromossômica, tais como, posição do centrômero e localização da constrição secundária, além da estrutura do núcleo interfásico e do padrão de condensação cromossômica (GUERRA, 1987). Em citogenética vegetal, o corante amplamente utilizado nas colorações convencionais tem sido o Giemsa a 2% e seu principal efeito sobre as demais técnicas convencionais tem sido sobre tudo pela visualização de segmentos da cromatina de densidade muito baixa, normalmente não perceptível com os corantes usuais, resultando assim numa maior caracterização de regiões descondensadas de cromossomos profásicos e prometafásicos (GUERRA, 1990).

A coloração de regiões mais descondensadas, geralmente terminais em cromossomos profásicos, permite uma maior individualização de cada cromossomo, e dessa maneira a técnica tem se mostrado valiosa em estudos citogenéticos rotineiros de contagem cromossômica. Lombello e Forni-Martins (1998) realizaram contagens cromossômicas com montagem de idiograma (representação esquemática do conjunto haplóide cromossômico) a partir da coloração com Giemsa em três gêneros pertencentes à família Sapindaceae, entre eles *Serjania*, com números cromossômicos  $2n=12$  e  $2n=22$  observados em 21 espécies. Consideráveis variações no comprimento cromossômico inter e intra-específicas ocorreram, sugerindo evolução cariotípica decorrente de rearranjos cromossômicos. No gênero *Urvillea* variações no número e comprimento cromossômico foram observadas. Além disso, variações interespecíficas também ocorreram na espécie *Urvillea ulmaceae*, que apresentou um grande número de cromossomos pequenos,  $2n=86$ . Acredita-se que a origem dessa espécie esteja relacionada à poliploidia seguida de aneuploidia reducional.

Matsumoto et al. (2000) realizaram análise citogenética convencional em sete espécies de *Eucalyptus*, entre elas, *E. deanei*, *E. dunni*, *E. grandis* e *E. maculata* da família Myrtaceae. As espécies mostraram um cariótipo simétrico com número cromossômico  $2n=22$ , e comprimento variando de 0,58 a 1,39 $\mu$ m. A análise cariotípica indicou homogeneidade morfológica e numérica na maioria das espécies do gênero, embora espécies com número diplóide  $2n=24$  foram relatadas em estudos prévios. O

número básico no gênero foi de  $x=11$  e a principal hipótese de tendência evolutiva estabelecida foi a de que provavelmente ocorreram alterações estruturais como deleção, duplicação, adição e translocação.

Mansanares et al. (2002) estudaram citogeneticamente espécies do gênero *Lychnophoriopsis* Scultz-Bip (Vernonieae - Asteraceae). Este trabalho foi realizado com intuito de auxiliar na circunscrição dos gêneros e espécies, mediante caracterização cariotípica com coloração Giemsa. O número cromossômico  $2n=36$  foi obtido para as espécies *L. candelabrum*, *L. damazioi* e *L. hatschbachii*. Os dados citológicos e morfoanatômicos sugeriram que *Lychnophoriopsis* com número cromossômico básico  $x=18$ , não seria distinto de *Lychnophora* Mart., outro gênero de Lychnophorinae.

### 2.2.2 HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (HC)

A heterocromatina constitutiva é a fração do genoma que permanece condensada durante todo o ciclo celular de plantas e animais e pode ser claramente observada a partir de técnicas diferenciais. Heitz (1928) estudando inicialmente cromossomos de briófitos observou que partes de certos cromossomos permaneciam condensadas ao longo da interfase, então propôs o termo heterocromatina para designar as regiões da cromatina que mostravam maior grau de condensação e coloração em núcleos interfásicos, e que se mantinham condensadas na prófase e na telófase, diferentemente das demais regiões, denominadas de eucromatina. Analisando com maior profundidade a heterocromatina, Heitz (1933) definiu heteropicnose esse comportamento diferencial, especialmente na prófase e telófase de todo ou parte de um cromossomo, durante certo estágio do desenvolvimento do indivíduo, e observou que em cada espécie a heterocromatina era distribuída aleatoriamente em regiões proximais, intersticiais e teloméricas. Essas regiões heterocromáticas mostravam um comportamento assincrônico nos ciclos de condensação e descondensação da cromatina, ocorrendo sempre na mesma posição nos homólogos, caracterizando uma distribuição equilocal que foi posteriormente aceito como regra universal (HEITZ, 1957).

Darligton e La Cour (1940) puderam evidenciar em plantas, após tratamento com frio ( $2^{\circ}\text{C}$ , por algumas horas), que certas regiões se mostravam menos condensadas nos cromossomos metafásicos, as quais foram definidas regiões de heterocromatina do tipo constitutiva.

A heterocromatina pode ser distinguida em dois tipos: heterocromatina constitutiva (HC) e heterocromatina facultativa. A HC se caracteriza por ser pobre em genes, por ter excessiva quantidade de DNA repetitivo com replicação tardia, baixa frequência de recombinação, uma vez que não apresenta genes ativos e localização geralmente nas regiões pericentroméricas dos cromossomos de eucariotas superiores, além de estar associada a proteínas específicas como a HP1 (relacionada à repressão gênica) e as SU (VAR)s, que são responsáveis pelo aumento da heterocromatinização (GREWAL e ELGIN, 2002). Por outro lado a heterocromatina facultativa é estruturalmente idêntica à cromatina e se distingue da HC por aparecer em apenas um dos homólogos enquanto que a primeira aparece em ambos e por ser epigeneticamente reprimida, com comportamento temporariamente cromático semelhante à heterocromatina constitutiva.

Dois tipos de heterocromatina constitutiva foram descritos: a  $\alpha$ -heterocromatina e a  $\beta$ -heterocromatina. O primeiro tipo é a mais comum da HC e consiste de repetições em *tandem* de uma seqüência simples, correspondendo à heterocromatina detectada pelo bandeamento C nos cromossomos dos eucariotas superiores. O segundo tipo heterocromático é mais raro, é composto por *retrotransposons* e tem sido mais observado em algumas classes de insetos e plantas com genoma grande (GREWAL e ELGIN, 2002). Lima de Faria (1976a, b, 1983) considerou que blocos de heterocromatina observados por bandeamento C, bem como cromômeros, knobs, constrições secundárias e outros marcadores cromossômicos e seqüências de DNA poderiam ocupar sítios cromossômicos preferenciais.

De acordo com Guerra (2000) a análise da distribuição do padrão de heterocromatina nos cromossomos do complemento das angiospermas em geral é um parâmetro para compreender a alta variabilidade dos cariótipos. A comparação do padrão de banda-C de diferentes espécies tem revelado alguns aspectos comuns. A heterocromatina não é homogênea, variando qualitativamente e quantitativamente entre as espécies. Dentro de uma única espécie, polimorfismo no número e comprimento de bandas pode ocorrer com frequência e a quantidade de heterocromatina varia de qualquer maneira. Ambas heterocromatina e eucromatina podem sofrer mudanças em um tempo relativamente curto e algumas técnicas de coloração revelam diferentes frações da heterocromatina (GREILHUBER, 1982; SUMNER, 1990).

Embora a heterocromatina constitutiva componha uma importante fração do genoma, ainda resta muito a se conhecer desse importante componente de DNA repetitivo, pois sua função ainda não foi completamente esclarecida. Há pouco tempo, acreditava-se que a heterocromatina constitutiva era componente sem importância e chegou a ser conhecida como “DNA lixo” e, portanto desprezível como parcela componente do genoma. Nos dias de hoje, com advento de técnicas mais elaboradas e de biologia molecular, as concepções sobre a HC mudaram e funções celulares vitais como manutenção e auxílio dos papéis desempenhados pelos telômeros e centrômeros e endoreplicação diferencial são algumas das funções importantes desempenhadas por essa fração de DNA (ZUCHERKANDL e HENNING, 1995; GREWAL e ELGIN, 2002). No entanto, a função e evolução da heterocromatina podem não ser a mesma em todas as espécies vegetais. Trabalhando com técnicas citogenéticas convencionais, apenas a heterocromatina associada à região organizadora do nucléolo (RON-HC) pode ser especificamente identificada devido às constrições secundárias ou pela impregnação com o nitrato de prata.

O bandeamento C é uma técnica bastante utilizada em citogenética para identificar a quantidade e localização da heterocromatina constitutiva. Essa metodologia baseia-se na eliminação diferencial do DNA das frações eucromáticas e heterocromáticas, acarretando significativas perdas de DNA e proteínas, sobretudo nas regiões eucromáticas, pois a heterocromatina é mais resistente, permanecendo no cromossomo durante o processo. No entanto, quando o objetivo é distinguir a composição da heterocromatina constitutiva, empregam-se os fluorocromos CMA e DAPI que tem afinidade preferencial por regiões ricas em GC e AT, respectivamente (SUMNER, 1990). Sato e Yoshioka (1984) utilizando a técnica de bandeamento C seguido da coloração com fluorocromos CMA e DAPI avaliaram os segmentos heterocromáticos em cromossomos de *Nothoscordum fragrans* e observaram que existem diferentes classes desse componente na espécie. *Nothoscordum fragrans* com  $2n=19$ , 13 metacêntricos e 6 acrocêntricos, revelou padrão de bandas em que, segmentos heterocromáticos ocorreram no braço curto de todos os cromossomos acrocêntricos. Destes, cinco também apresentaram heterocromatina constitutiva em regiões intersticiais do braço longo, ocupando também posição equilocal. Na espécie foi verificada heterogeneidade na HC, cuja composição só foi conhecida pelo uso de fluorocromos específicos para bases G-C de DNA.

### 2.2.3 BANDEAMENTO COM FLUOROCROMOS CMA/DAPI

Os fluorocromos são corantes fluorescentes que por mostrarem especificidade de ligação com seqüências de bases de DNA são muito utilizados em estudos citogenéticos. Dentre estes, os mais largamente empregados são o DAPI (4'-6-diamidino-2, fenilindol) e o CMA (cromomicina A<sub>3</sub>). Outros corantes como o Hoechst 33258 e a quinacrina apresentam propriedades semelhantes ao DAPI e marcam regiões ricas em AT, enquanto que a mitramicina e olivomicina são isômeros da cromomicina e marcam regiões de DNA ricas em GC (SUMNER, 1990).

Também existem os contra-corantes que além de aumentar o contraste das bandas fluorescentes permitem visualizar melhor os limites da morfologia cromossômica, entre eles, distamicina A (DA) e a actinomicina D (AMD) (WEISBLUM e HAENSSLER, 1974; SCHWEIZER, 1976). Os fluorocromos não coram igualmente diferentes tipos de heterocromatina, embora alguns sejam mais específicos, como é o caso dos antibióticos glicosilados, que se ligam ao DNA guanina-específicos (G-C), representado pela cromomicina A<sub>3</sub> (CMA), olivomicina e mitramicina.

SCHWEIZER (1976) analisou com CMA e DAPI três espécies vegetais, *Vicia faba*, *Scilla siberica* e *Ornithogalum caudatum*. As regiões organizadoras do nucléolo e outras partes heterocromáticas foram marcadas CMA<sup>+</sup>, enquanto as mesmas regiões apresentaram-se negativas para DAPI. Essa foi umas das primeiras aplicações dos corantes fluorescentes e desde então tem se tornado rotina nos laboratórios de citogenética. Guerra (1988) utilizou os fluorocromos CMA e DAPI para analisar cinco populações de *Eleutherine bulbosa* (2n=12) e verificou a ocorrência de processos evolutivos complexos tais como inversão pericêntrica e duplicação em *tandem*. A análise de células mitóticas e meióticas evidenciaram forte heteromorfismo em um par cromossômico para inversão pericêntrica e duplicação em *tandem* de uma região invertida em um dos homólogos. A duplicação ocorreu na constrição secundária do maior par cromossômico e foi associada à heterocromatina rica em GC. Todas as constrições secundárias corresponderam à região organizadora do nucléolo e o segmento invertido correspondeu a cerca de 70% do comprimento cromossômico. Duas bandas DAPI<sup>+</sup> e blocos de CMA<sup>+</sup> foram localizados no par I com inversão, além de bandas DAPI<sup>+</sup> observadas na região pericentromérica dos demais cromossomos.

Guerra e Felix (2002) avaliaram duas populações, num total de trinta indivíduos de *Nothoscordum pulchellum* com 2n=10 e fórmula cariotípica 6M+2A+2T através de métodos citogenéticos, entre eles, bandeamento C e coloração com os fluorocromos

CMA e DAPI. Verificaram apenas um bloco de heterocromatina que foi associado à região organizadora do nucléolo. Essa banda apareceu como um bloco C<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> ocupando todo o braço curto do par cromossômico acrocêntrico. Com relação às outras espécies de *Nothoscordum*, a presente espécie se distinguiu por apresentar um par cromossômico telocêntrico e uma quantidade de heterocromatina muito baixa.

Carvalho et al. (2005) estudando o gênero *Citrus* (rutaceae), identificaram similaridades cariotípicas em 10 acessos do grupo. Embora o gênero apresentasse estabilidade numérica e morfológica ( $2n=18$ ), estudos prévios com bandeamento CMA haviam identificado heterozigose para bandas heterocromáticas. Nesse trabalho, pode-se observar que quatro cultivares de *C. limon* mostrou o mesmo padrão de bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr, indicando que foram originados a partir de um germoplasma simples e em seguida diferenciadas por mutações somáticas distintas. Já as espécies *C. jambhiri*, *C. limonia* e *C. volkameriana* apresentaram cariótipo similares, e diferiram de *C. limon* pela ausência de apenas uma banda telomérica. Outras espécies como *C. aurantifolia* e *C. limettioides* exibiram maiores diferenças para regiões heterocromáticas. A espécie *C. medica* foi o único acesso homozigoto para bandas heterocromáticas e sítios de DNAr, confirmando hipótese anterior de que as demais espécies seriam híbridos naturais.

As espécies *Hibiscus cannabinus* ( $2n=2x=36$ ) e *H. sabdariffa* ( $2n_{4x}=72$ ) (malvaceae) foram analisadas citogeneticamente com o intuito de elucidar possível homologia genômica. O Comprimento cromossômico variou entre 1,43 e 3,80 $\mu$ m, sendo que ambas as espécies apresentaram um decréscimo gradual do tamanho dos cromossomos do complemento. Seis bandas CMA<sup>+</sup> foram encontradas nessas espécies, e vinte seis bandas DAPI<sup>-</sup> foram observadas em *H. cannabinus*. Em *H. sabdariffa*, 14 bandas DAPI<sup>+</sup> foram distribuídas em diferentes locais dos cromossomos. Dois cromossomos de *H. cannabinus* e oito cromossomos de *H. sabdariffa* foram inteiramente bandeados com DAPI. Nessa mesma espécie, os cromossomos que foram inteiramente marcados com CMA e DAPI podem ser usados como marcadores típicos. Em *H. cannabinus*, um par de satélites foi encontrado com a coloração de CMA, indicando ser de natureza heterocromática rica em GC. Nenhum satélite foi observado com a coloração DAPI. A análise dos cariótipos através de bandeamento cromossômico com fluorocromos indicou que *H. sabdariffa* é originada de dois genomas diferentes, e que *H. cannabinus* pode ter parte de seu genoma derivado de um ancestral comum a *H. sabdariffa* (HIRON et al., 2006).

#### 2.2.4 MARCAÇÃO DAS REGIÕES ORGANIZADORAS DE NUCLÉOLOS (RONS) COM NITRATO DE PRATA

Os nucléolos são organelas celulares reconhecidas pela primeira vez há 200 anos atrás (SCHWARZACHER e WACHTLER, 1993). As regiões organizadoras do nucléolo ou RONS, são facilmente coradas com nitrato de prata ou localizadas por hibridização *in situ*. No primeiro caso, são detectados apenas os genes ativos, e no segundo caso, a hibridização irá ocorrer independentemente.

Os nucléolos são as formas ativas da região do DNAr 45S. Neles, estão sendo produzidos e processados RNAs que são necessários para a síntese de todas as proteínas requeridas para o funcionamento celular. Os genes ribossomais estão presentes em inúmeras cópias, e não estão distribuídos aleatoriamente no núcleo interfásico. Estudos têm mostrado que esses genes estão concentrados em um domínio nuclear ocupado pelos nucléolos. Embora genes extranucleolar e seus RNAs transcritos podem também ser localizados em territórios nuclear específicos, os nucléolos são particularmente um bom modelo para correlacionar aspectos molecular da expressão gênica com estruturas nuclear. Além das proteínas ribossomais, os nucléolos contém um grande número de proteínas não ribossomais envolvidas em vários aspectos da biogenesis ribossomal e manutenção da estrutura nucleolar. Nos eucariotos são reconhecidos quatro tipos diferentes de RNAr designados pelos seus respectivos coeficientes de sedimentação: 5S, 5,8S, 18S e 28S. Exceto o 5S, os demais são transcritos pelos genes localizados nas RONS, e estão arranjados em *tandem* (um seguido do outro) formando unidades transcricionais que originam um RNAr 45S precursor das formas 5,8S, 18S e 28S (SUMNER, 1990).

Cada unidade dos genes ribossomais consiste basicamente de uma região não transcrita (NTS), localizadas no espaço intergênico (IGS), e separadas por espaços transcritos internos (ITS), onde ficam os genes. O comprimento real do gene RNAr varia entre as espécies, e embora o 5.8S tenha geralmente o mesmo comprimento, as outras subunidades podem se apresentar menores, por exemplo o 17S e o 25S em *Tetrahymena*, ou 18S e 26S em plantas. Ao contrário das variações em comprimento, existe uma considerável similaridade de seqüências entre os genes ribossomais de diferentes organismos. Já o espaço entre esses genes é mais variável. O número de cópias dos genes ribossomais também são de uma variabilidade muita alta, e alguns organismos como fungos e insetos apresentam em torno de 100 cópias de RNAr,

enquanto plantas e anfíbios tem cerca de 10.000 cópias. Polimorfismo no número de cópias é frequente, e pode ocorrer no mesmo indivíduo ou entre indivíduos diferentes. Os genes RNAr podem estar restritos a um único sítio de um par de homólogos, ou pode ocorrer em vários cromossomos. Em plantas, é muito comum encontrá-los em pelo menos dois pares, enquanto em humanos, cinco pares possuem tais genes (HOWELL, 1982).

No processo de mitose, a síntese de RNA é estagnada e concomitantemente o nucléolo tende a desaparecer. Assim, no estágio de prófase, o componente fibrilar denso desaparece e o componente granular é solto no núcleo. Em algumas situações o conteúdo granular pode ficar associado aos cromossomos, especialmente na metáfase. Na telófase, novos nucléolos são formados em uma ou mais RON, de forma que o componente fibrilar denso surge adjacente ao centro fibrilar enquanto que o componente granular desaparece (DERENZINI, 2000).

Goodpature e Bloom (1975) desenvolveram uma técnica de coloração da RON com Nitrato de Prata ( $\text{AgNO}_3$ ), sendo esse o principal método empregado para corar RONs ativas em cromossomos mitóticos (SUMNER, 1990), embora a HIS seja mais adequada para detectar a quantidade total de sítios. Em muitas espécies, nem todas as RONs são coradas com a técnica, indicando claramente que nem todos os sítios de RONs permanecem transcricionalmente ativos em interfase.

De acordo com Santos et al. (2003), o número e a distribuição das RONs podem variar entre diferentes espécies ou dentro da mesma espécie. Estes padrões determinam quais cromossomos fazem parte da organização nucleolar auxiliando na caracterização cromossômica de diferentes espécies ou táxons. No caso onde mais de uma RON está presente no mesmo complemento nem sempre indica que estão todas ativas em uma mesma célula. O processo de ativação pode ser ao acaso ou pode existir uma ativação diferencial que produz diferentes tipos de RONs (SCHEER et al., 1993).

Rao et al. (1991) observaram em algumas espécies de *Vigna*, um taxa polimórfico, um par de nucléolos na forma de constrição secundária em cinco das 12 espécies que foram estudadas. Entretanto, a espécie *V. umbellata* foi caracterizada pela presença de dois pares, que corresponderam às constrições secundárias. A não visualização de regiões organizadoras do nucléolo nas demais espécies foi associada a dificuldades técnicas devido ao pequeno tamanho cromossômico encontrado no gênero *Vigna*.

### 2.2.5 FISH (FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION)

A HIS (hibridização *in situ*) foi desenvolvida em 1969 por Gall e Pardue para análise cromossômica e tem sido uma das técnicas mais importantes e informativas graças a sua alta especificidade, sendo então empregada nas mais diversas áreas, como na biologia do desenvolvimento, na citotaxonomia, melhoramento genético e citogenética clínica. O princípio da técnica consiste no fato de que o DNA é formado por duas fitas complementares, as quais por meio de aquecimento podem ser facilmente separadas em fitas simples, ou desnaturadas, e em seguida renaturadas, voltando a ser fita dupla. Se no momento da renaturação do DNA houver uma sonda disponível em solução, as sondas competirão com as fitas de DNA cromossômico e poderão ser hibridizadas ao DNA alvo, ao invés da fita complementar original (GUERRA, 2004).

Sondas são derivadas a partir de fragmentos de DNA ou RNA que foram isolados, purificados e amplificados para uso. Podem ser de seqüência única ou repetida. As seqüências repetidas podem estar organizadas no cromossomo em *tandem*, ou seja, uma seguida à outra, formando blocos de DNA-alvo, ou podem se encontrar dispersas no complemento cromossômico, intercaladas com diversos outros tipos de seqüências. As sondas de DNA repetitivo mais utilizadas são os DNAs satélite, o gene que codifica o RNA ribossomal 5S e a seqüência que codifica o precursor 45S dos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8S, amplamente conhecidos como DNAr 5S e 45S, respectivamente (SUMNER, 2003).

O DNAr 45S, conhecido também como DNAr, é uma seqüência moderadamente repetitiva que fica localizada em um ou mais pares cromossômicos, e muito conservada evolutivamente. Cada unidade de repetição do 45S contem três genes (DNAr 18S+5,8S+28S) e seus espaçadores, sempre transcritos juntos em um único RNA precursor. Os sítios de DNAr correspondem às constrições secundárias que podem ser visualizadas por coloração convencional ou pela aplicação da técnica de nitrato de prata, embora algumas vezes, sítios muito pequenos ou pouco ativos podem não ser visíveis com esta técnica e serem localizados apenas com a técnica de hibridização *in situ*. A seqüência do DNA 5S, no entanto, é mais variável que a 45S, e é repetida em *tandem* geralmente em um único par de sítios cromossômicos, ou mais raramente em dois sítios (GUERRA, 2004).

A técnica de FISH tem sido usada entre outras aplicações para o mapeamento de seqüências repetitivas e para localizar genes de multicópias, além de permitir correlacionar grupos de ligação e cromossomos. Além do mais, a técnica ainda pode ser usada para comparar distâncias físicas e genéticas (SCHWARZACHER, 1994; GILL, 1995). Por exemplo, Pedrosa et al., (2002) correlacionaram o mapa físico e genético de *Lotus japonicus*. As sondas de DNA 45S utilizada foi um fragmento de cerca de 6 Kb das unidades repetidas (18S-5,8S-25S) clonadas de *Arabidopsis thaliana*. Os genes ribossomais 45S foram localizados em três pares cromossômicos, enquanto o gene 5S foi localizado em apenas um par. Estes autores, também incluíram uma caracterização parcial de diferentes seqüências teloméricas e centroméricas. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de inversões entre *Lotus japonicus* e *L. filicaulis*.

Skalická (2003) utilizou uma linhagem artificial de *Nicotiana tabacum* (Th37), um tetraplóide obtido do cruzamento de duas espécies diplóides (*N. sylvestris* e *N. tomentosiformis*), para estudar a rápida evolução dos sítios de DNAr. Pelo menos três classes de DNAr recentemente amplificadas foram identificadas em algumas das plantas analisadas. A presença dessas três classes de DNAr foi acompanhada pela eliminação completa de sítios de DNAr de *N. tomentosiformis*. O doador do material genético materno, *N. sylvestris*, teve suas unidades derivadas. Dados combinados do tabaco indicam que houve uma evolução de DNAr e que foi seguido de um pequeno processo que reduz a complexidade e decréscimo no número de unidades de DNAr. Em tabaco, os IGS apresentam variabilidade em torno de 1~3 kilobases e subregiões de SRI e SRII e são conhecidos como sítios significativos de recombinação genética por apresentarem alto polimorfismo.

Na família Asteraceae, fluorescência *in situ* com sondas de DNAr 45S foi utilizado para determinar o número cromossômico e a posição dos sítios de DNAr 45S em três espécies pertencentes a gêneros distintos (*Crepis japonica*, *Galinsoga parviflora* e *Chaptalia nutans*). As espécies exibiram diferenças caritípicas em número e morfologia, o que é característica comum nesse grupo. Entretanto, os sítios de DNAr 45S sempre ocorreram no braço curto dos cromossomos, e foram associados com a heterocromatina GC. Fregonezi et al. (2004), acreditam que nesse grupo, as características comuns do cariótipo foram mantidas ao longo da evolução.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA-REGO, S. C. **Alismataceae Vent. do Rio Grande do Sul**. 1988. Dissertação. (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. In ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v.85, p.531-553, 1998.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.141, p.399-436, 2003.

ARBER, A. On the leaf structure of certain Liliaceæ, considered in relation to the Phyllode Theory. **Annals of Botany**, London, v.34, p. 447-65, 1920.

ASCHERSON, P.; GURKE, M. **Hydrocharitaceae Engelm.**, 1889. In Engler, A., Prantl, K.,(Eds): *Naturliche Pflanzenfamilien* 2(1), 238-258 – Leipzig: W. Engelmann

BARRETT, C. H. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *decodon verticillatus* (Lythraceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.80, p.1175-1182, 1993.

BENNETT, M.D. LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. **Annals of Botany**, London, v.76, p.113-176, 1995.

BERNADELLO, L. M.; MOSCONE, E. The karyotype of *Limnobium spongia* (Hydrocharitaceae). **Plant Systematic and Evolution**, New York, v.153, p.31-36, 1985.

BUZNEGO, M.; PEREZ-SAAD, H. Behavioral and antiepileptic effect of acute administration of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* Sprengel. **Epilepsy e Behavior**, v.9, p.40-45, 2006.

CARVALHO, R. et al. The relationships among lemons, limes and citron: a chromosomal comparison. **Cytogenet Genome Res**, EUA, v. 109, p. 276-282, 2005.

CHEN, J. M. et al. Evolution of apocarpy in Alismatidae using phylogenetic evidence from chloroplast *rbcL* gene sequence data. **Botanical Bull. Academic**. v.45, p.33-40, 2004.

COOK, C. D. K. A Revision of the genus *Limnobium* including *Hydromystria* (Hydrocharitaceae). **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.17, p.1-27, 1977.

COOK, C. Book reviews; two taxonomic monographs. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.4, p.377-381, 1978.

CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF. 1984, v.6.

CORREIA JUNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. **Plantas medicinais**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP. 1994. 162p.

COSTA, M. et al. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. **Phytochemistry**, Elmsford, v.50, p. 117-122, 1999.

COSTA, N. V. et al. Superação de dormência de sementes de *ceratophyllum demersum*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.23, n.2, p.187-191, 2005.

COSTA, Y. J.; FORNI-MARTINS, E. R. Karyology of some Brazilian species of Alismataceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.143, p.159-164, 2003.

COSTA, Y. J.; FORNI-MARTINS, E. R. A triploid cytotype of *Echinodorus tenellus*. **Aquatic botany**, London, v.79, p.325-332, 2004.

COSTA, Y. J.; FORNI-MARTINS, E. R.; VANZELA, A. L. L. Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismatales) with chromosomal banding and 45S rDNA FISH. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 257, p.119-127, 2006.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Springer : Verlag, 1981.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden. 1988.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, H. T.; YEO, P. F. **The families of the monocotyledons** . Berlin: Springer - verlag. 1981.

DAHLGREN, R. M. T.; CLIFFORD, V. **The monocotyledons: a comparative study**. New York: Academic Press, 1982.

DAHLGREN, R. M. T.; BREMER, K. Major clades of the angiosperms. **Cladistics**, New York: v.1, p.349-368, 1985.

DANDY, J. E. Hydrocharitaceae. Keys for the tribes and genera. In HUTCHINSON, J. **The Families of Flowering Plants**. Oxford, v.2, p.540-541, 1959.

DARLINGTON, C. D.; La Cour, L. F. Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. **J. Genetics**, v.40, p.185-213. 1940.

DERENZINI, M.; PESSON, A.; TRERÉ, D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in câncer cells. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v.63, n.1, p.137-140, 1990.

DERENZINI, M. **The AgNORs**. *Micron.*, v.31, p.117-120, 2000.

DONOGHUE, M. J.; DOYLE, J. A. Phylogenetic analysis of angiosperms and the relationships of Hamamelidae. In: CRANE, P.R. & BLACKMORE (Ed.), **Evolution, systematics and fossil history of the Hamamelidae**, Oxford: Clarendon Press, 1989. v. 1.

EICHLER, A.W. **Hydrocharitaceae**. Leipzig: W. Engelmann. 1875, p. 91-97.

ENDLICHER, S. L. **Hydrocharitaceae**. Genera Plantarum Vindobona, p.160-163, 1837.

FASSET, N. C. *Echinodorus* in the American tropics. **Rhodora**, Cambridge, v. 57, p.133-212, 1955.

FORNI-MARTINS, E. R.; CALLIGARIS, K. P. Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). **Aquatic Botany**, London, v.74, p.33-41, 2002.

FREGONEZI, J. N. et al. A karyotypic study of three southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence in situ hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA3 banding. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.223-227, 2004.

GALASSO, I.; PIGNONE, D.; PERRINO, P. Cytotaxonomic studies in *Vigna*. II. Heterochromatin characterization in *Vigna unguiculata* and three related wild species. **Caryologia**, Firenze, v. 46, p. 275-282, 1993.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, New York, v.53, p.37-50, 1975.

GRANT, V. **Especiacion Vegetal**, 1981. 455p.

GREILHUBER, J. Trends in der Chromosome evolution von *Scilla* (Liliaceae). **Stapfia**, v. 10, p. 11–51, 1982.

GREWAL, S. I.; ELGIN, S. C. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. **Current Opinion Genetic.**, v.12, p.178–187, 2002.

GUERRA, M. O uso Giemsa na citogenética vegetal - comparação entre a coloração simples e o bandeamento. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 35, p. 190-193, 1983.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Cytologia**, Tobio, v.52, p.213-222, 1987.

GUERRA, M. Mitotic and meiotic analysis of a pericentric inversion associated with a duplication in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Chromosoma**, Berlin, v. 97, p.80-87, 1988.

GUERRA, M. ; NOGUEIRA, M. T. M. . The cytotaxonomy of *Emilia spp.* (Asteraceae: Senecioneae) species occurring in Brazil. **Plant Systematic And Evolution**, Viena, v. 170, p. 229-236, 1990.

GUERRA, M. et al. Chromosome number and secondary constriction variation in 51 accessions of a *citrus* germoplasm bank. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.20, p.489-496, 1997.

GUERRA, M. FISH, **Conceitos e aplicações na citogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 184p, 2004.

HAMBY, R. K.; ZIMMER, E. A. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. **Molecular systematics of plants**, London, v.45, p.212-234, 1992.

HARADA, I. Cytological studies in Helobiae. Part I. Numbers in seven families. **Cytologia**, Tobio, v.21, p.306-328, 1956.

HAYNES, R. R.; HOLM – NIELSEN, L. B. Notes on *Echinodorus* (Alismataceae). **Brittonia**, Bronx, v.38, p.325-332, 1986.

HAYNES, R. R.; HOLM – NIELSEN, L. B. Speciation of Alismatidae in the Neotropics. In: HOLM-NIELSEN LB, NIELSEN IC, BALSLEV H, (eds). *Tropical forests. Botanical dynamics, speciation and diversity.*, London: **Academic Press**, 1989, p. 211-219.

HAYNES R. R.; HOLM - NIELSEN L. B. The Alismataceae. **Flora Neotropica, monograph 64**. New York: The New York Botanical Garden, 1994.

HAYNES, R. R; BURKHALTER J. R. A new species of *Echinodorus* (Alismataceae) from the United States of America. **Castanea**, Morgantown, v.63, p.180-182, 1998.

HEITZ, E. Das Heterochromatin der Moose I; **Jahrb. Wiss. Bot.**, v. 69, p.762–818, 1928.

HEITZ, E, Die Herkunft der Chromocentren. **Planta**, New York, v.18, p.571-636, 1933.

HEITZ, E. Die chromosomenstruktur im kern während der kernteilung und der entwicklung des organismus. In *CONFERENCE ON CHROMOSOMES*, 1957, Zwolle. Zwolle: [s.n], 1957. p. 5-26.

HIRON, N. et al. Differential fluorescent banding and isozyme assay of *Hibiscus cannabinus* L. and *H. sabdariffa* L. (Malvaceae) **Cytologia**, Tobio, v.71, n.2, p.175–180, 2006.

HIZUME, M.; SATO, S.; TANAKA, A. A highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in plants. **Stain Technol**, v.55, p. 87-90, 1980.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. **Chormossoma**, New York, v.62, p.361-367, 1982.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants. Monocotyledons** . Oxford . Ed. 2, 1959. v.3, p.79.

JANSSEN, T.; BREMER, KÅRE. The age of major monocot groups inferred from 800 *rbcL* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.146, p.385–398. 2004.

JEREMIE, J. et al. Une nouvelle espece d *Echinodorus* (Alismataceae) de Guadeloupe (Petites Antilles). Observations palynologiques, cytogenetiques et chimiques. **Adansonia**, Paris, v. 23, p.191–203, 2001.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc; 1999.

KENTON, A. A Robertsonian relationship in the chromosomes of two species of *Hydrocleys*. **Kew Bulletin**, London, v.36, p.487–492, 1981.

LARSEN, K. Studies in the flora of Thailand. Part 14. Cytological studies in vascular plants of Thailand. **Dansk Bot**, v.20, p.211-275, 1963.

LEHTONEN, S. Phylogenetics of *Echinodorus* (Alismataceae) based on morphological data. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.150. p.291-305, 2006.

LES, D. H.; HAYNES, R. R. Systematics of subclass Alismatidae: a synthesis of approaches. **Royal Botanic Garden**. Kew London, v.48, p.353-377, 1995.

LES, D. H.; CLELAND, M. A.; WAYCOTT, M. Phylogenetic studies in Alismatidae, II: Evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. **Systematic Botany**, Dordrecht, v.22, p. 443-463, 1997.

LIMA-DE-FARIA, A. **Molecular evolution and organization of the chromosome**. Amsterdam: Elsevier, 1983.

LIMA-DE-FARIA, A. The chromosome field I. Prediction of the location of ribosomal cistrons. **Hereditas**, Lund, v.83, p.1-22, 1976a.

LIMA-DE-FARIA, A. The chromosome field II. The location of "knobs" in relation to telomeres. **Hereditas**, Lund, v.83, p.23-34, 1976b.

LOHAMAR, G. The chromosome number of *Sagittaria natans* Pallas e *S. Sagittifolia* L. Svensk. **Bot. Tidskr.** v.25, p.32-35, 1931.

LOMBELLO, R.A.; FORNI-MARTINS, E.R. Chromossomal studies and evolution in Sapindaceae. **Caryologia**, Firenze, vol. 51, n.1, p.81-93, 1998.

MANSANARES, M. E.; FORNI-MARTINS, E. R, SEMIR, J. Chromosome numbers in the genus *Lychnophora* Mart. (Lychnophorinae-Vernonieae-Asteraceae). **Caryologia**, Firenze, v. 55, p.367–374, 2002.

MATSUMOTO, S. T. et al. Cytogenetic analysis of seven species of *Eucalyptus* L`Her. (Myrtaceae). **Caryologia**, Firenze, v. 53, p.205-212, 2000.

MICHELLI, M. Alismataceae. In: De Candolle A, De Candolle, C, eds. **Monographiae Phanerogamarum** 3. Paris, p.29-83, 1881.

OLESON, E. M. Chromosome of some Alismaceae. **Botanical Gazette**, Chicago, v.198, p. 198-202, 1941.

PADGETT, D. J. *Echinodorus tenellus* (Martius) Buchenau (Dwarf burhead) conservation and research plant for New England. Framingham, MA: **Wild Flower Society**, 2003.

PEDROSA, A. et al. Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 161, p.1661–1672, 2002.

RAO, A. N. Embryology of *Dioscorea oppositifolia* L. **Phytomorphology**, India, v.3, p.121–126, 1953.

RAO, S. R.; CHANDEL, P. S.; Karyomorphological studies en the cultivated and Wild *Vigna* species in Indina Gene Centre. **Cytologia**, v.56, p.47-57, 1991.

RATAJ, K. Alismataceae of Brazil. **Acta Amazônica**, Manaus, v.7, p201–205, 1978.

RATAJ, K. Las Alismataceae de la República Argentina. **Darwiniana**, Buenos Aires, v.16, p.9-39, 1970.

RATAJ, K. Revizion of the genus *Echinodorus* Rich. **Studie Csav**, Czech Republic, v.2, p.1-156, 1975.

ROGERS, G. K. The genera of Alismataceae in the Southeastern United States. **J Arnold Arbor.**, v. 64, p. 383–420, 1983.

SATO, S.; YOSHIOKA, T. Heterogeneity of heterochromatin segments in *Nothoscordum fragrans* chromosomes. **Caryologia**, Firenze, v. 37, p.197-205, 1984.

SCHEINER, S. M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annals Review Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.24, p.35-68, 1993.

SCHEER, U; THIRY, M; GOESSENS, G. Structure, fuction and assmbley of the nucleolus. *Trends in Cell Biology*, vol. 3, p. 236-240. 1993

SCHLICHTING, C. D.; PIGLIUCCI, M. **Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective**, Underland, Sinauer Associates, 1998.

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annals Review Ecology and Systematics**, Palo Alto, v17, p.667-693, 1986.

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, New York, v. 58, p.307-324, 1976.

SCULTHORPE, C.D. **The biology of aquatic vascular plants**. London: Edward Arnold Publishers, 1967.

SHARMA, A. K.; CHATTERJEE, T. Cytotaxonomy of Helobiae with special reference to the mode of evolution. **Cytologia**, Tobio, v.32, p.286-307, 1967.

SKALICKA, K. Rapid evolution of parental rDna in a synthetic tobacco allotetraploid line. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 90(7), p.988–996, 2003.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.14, p.348-352, 1999.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings Natural Academy Science of Cultivated Plants**, Kiew, v. 97, p.7051–7057, 2000.

SOROS, C.; LES, D.H. Phylogenetic relationships in the Alismataceae. **Botany**, pg.107, 2002.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold. 1971.

STEBBINS, G. L. **Variation and Evolution in Plants**. New York, Columbia University Press, 1950.

SUBRAMANIAM, K.; KAMBLE, N.P. In IOPB chromosome number reports. Part XII. **Taxon**, Utrech, v. 16, p.341-350, 1971.

SUMNER, A. T. **Chromosome banding**. Cambridge: Cambridge University Press: 1990.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: Organization and Function**. [S.L]: Blackwell Science, 2003.

TAMURA, M. N. et al. Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from combined analysis of plastid matK and rbcL gene sequences. **Journal Plant Research**, London, v. 117, p. 109–120, 2004.

TOMLINSON, P. B. **Anatomy of monocotyledons**. VII. Helobieae (Alismatidae). Oxford: Clarendon Press, 1982.

VAMOSI, J. C.; OTTO, S. P. When looks can kill: the evolution of sexually dimorphic floral display and the extinction of dioecious plants. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 269, p.1187-1194, 2002.

WEISBLUM, B.; HAENSSLER, E. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. **Chromosoma**, New York, v.46, p.255-260, 1974.

## Capítulo I

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA:

**PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION**

## Citogenética de Alismatales ss: evolução cromossômica e bandeamento C

L. L. Feitoza<sup>1</sup>, L. P. Felix<sup>2</sup>, A. A. J. F. Castro<sup>3</sup> e R. Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia-Genética, Laboratório de Genética - Bioquímica e Sequenciamento de DNA. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Citogenética Vegetal. Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB Brasil.

<sup>3</sup>Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI Brasil.

### Resumo

Foram estudadas 10 espécies de Alismatales, sendo cinco de Alismataceae (*Echinodorus*), quatro de Limnocharitaceae (*Hydrocleys* e *Limnocharis*) e uma de Hydrocharitaceae (*Limnobium*) com relação ao número e morfologia cromossômica e ao padrão de bandas C-Giemsa nos cinco representantes de Alismataceae. O gênero *Echinodorus* apresentou  $2n=22$  em todas as espécies analisadas e fórmula cariotípica  $2m+20a$ , enquanto na família Limnocharitaceae, foi observado  $2n=16$  em *Hydrocleys nymphoides* e *H. martii*, ( $4m+2sm+10a$ ) e  $2n=20$  em *Limnocharis flava* e *L. laforestii* ( $4m+16a$ ). A única espécie estudada de Hydrocharitaceae exibiu um cariótipo formado por  $2n=28$  e fórmula cariotípica  $4m+6sm+4a$ . Em *Echinodorus* o padrão de distribuição de banda C evidenciou quatro blocos de heterocromatina constitutiva em dois pares acrocêntricos menores, correspondentes às RONS heterocromáticas. Em *E. lanceolatus*, além das RONS heterocromáticas, foram observadas adicionalmente, 14 bandas nos terminais dos braços de sete pares acrocêntricos. São apresentados idiogramas e discutidos o padrão de evolução cariotípica para os grupos estudados.

**Palavras-chave:** Alismataceae, Limnocharitaceae, Hydrocharitaceae, heterocromatina, banda C

## Introdução

A delimitação da ordem Alismatales tem sido bastante controversa entre diferentes autores. No sistema de Hutchinson (1959), por exemplo, a ordem seria formada pelas famílias Alismataceae, Scheuchzeriaceae e Petrossaviaceae, enquanto Cronquist (1981) incluiu na ordem as famílias Butomaceae e Limnocharitaceae, além das Alismataceae. Ambas as delimitações divergem de outros sistemas com abordagem filogenética como os sistemas de Dahlgren et al. (1985), APG I (1998) e APG II (2003). Uma das principais alterações em relação à delimitação tradicional das Alismatales, foi a inclusão nesta ordem da família Araceae feita por Chase et al. 2000, e que tem sido confirmada em trabalhos posteriores (ver Tamura et al. 2004).

Como atualmente delimitada, as Alismatales compreendem um total de 14 famílias (Chase et al. 2000, APG II 2003), das quais oito (Araceae, Hydrocharitaceae, Alismataceae, Limnocharitaceae, Juncaginaceae, Ruppiaceae, Cymodoceae e Potamogetonaceae) ocorrem no Brasil (Souza e Lorenzi 2005). Destas, as famílias Alismataceae e Limnocharitaceae têm no Nordeste do Brasil um dos seus principais centros de diversidade (Haynes e Holm-Nielsen 1992, 1994). São plantas de habitat variável, mas principalmente aquático ou semi-aquático, embora na família Araceae a maioria das espécies sejam epifíticas ou terrestres (Judd et al. 1999).

Excluindo a família Araceae, existem poucos estudos cromossômicos relativos aos representantes da ordem Alismatales, especialmente em relação às espécies neotropicais. Para os táxons que ocorrem no Brasil, os registros cariológicos estão concentrados em Alismataceae (Costa e Forni-Martins 2003; 2004, Costa et al., 2006) e Limnocharitaceae (Forni-Martins e Calligaris 2002), sendo as demais famílias representadas por contagens cromossômicas esparsas. Com relação às Limnocharitaceae, tem sido identificados os números básicos  $x=7$  para *Butomopsis*,  $x=7$  ou 8 para *Hydrocleys* e  $x=10$  para *Limnocharis* (Harada 1956, Kenton 1981, Calligaris e Forni-Martins 2002). Já para Alismataceae, há registro de números cromossômicos para apenas sete espécies do Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, que no geral também confirmaram a constância cariológica previamente registrada para a família (Costa e Forni-Martins 2003; 2004, Costa et al. 2006). Para as Hydrocharitaceae, os registros cromossômicos são ainda mais escassos e restritos à contagem cromossômica para *Elodea longivaginata* St. John., com  $2n=24$  (Packer e Witkus 1982), *Hydromystria laevigata* (Willd.) Hunziker,  $2n=28$  (Moscone e Bernardello 1985),

*Vallisneria spiralis* L., com  $2n=22$  (Fotedar e Roy 1974),  $2n=22, 28, 30$  (Bhattacharya e Ghosh 1977) e  $2n=24, 30, 40$  (Chaudhuris e Sharma 1978). O grupo aparentemente apresenta um padrão de evolução cariotípica semelhante às Alismataceae e Limnocharitaceae com cromossomos geralmente grandes e cariótipo bimodal (Harada 1956, Sharma e Chaterge 1967). Não são conhecidos registros cromossômicos para espécies de Alismatales (exceto Araceae) para a região Nordeste do Brasil.

O presente trabalho estudou citologicamente através da coloração convencional, banda C-Giemsa e bandeamento AgNOR, cinco espécies de Alismataceae, quatro de Limnocharitaceae e uma de Hydrocharitaceae, ocorrentes no Nordeste do Brasil. O objetivo foi avaliar o padrão de evolução cariotípica nessas espécies, bem como comparar nossos dados com o cariótipo de alguma dessas espécies ocorrentes em outras regiões do país e previamente estudadas.

### **Materiais e Métodos**

A tabela 1 sumariza os táxons estudados, procedência e principais características cromossômicas analisadas. Todo o material foi proveniente do campo e mantido em cultivo em vasos plásticos com substrato de terra vegetal no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba. Para todas as populações estudadas foram preparadas exsicatas, que se encontram depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes (EAN).

#### *Coloração Convencional*

Pontas de raízes pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8HQ) a 0,002M por 16h a 15 °C foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético v/v) por 4h a temperatura ambiente e estocadas em freezer a -20 °C até posterior análise. Para o preparo das lâminas, as raízes foram hidrolisadas em HCl 5N por 20 minutos à temperatura ambiente, lavadas duas vezes por cinco minutos em água destilada, esmagadas em uma gota de ácido acético 45%, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, secas ao ar, coradas com Giemsa 2% e montadas em Entellan (Guerra 1983).

#### *Bandeamento C-Giemsa*

O procedimento para banda C foi baseado em Schwarzacher et al. (1980) com modificações. As raízes foram digeridas em solução enzimática (2% celulase-20% pectinase)

a 37°C por 1h e esmagadas em ácido acético 45%. Depois congeladas em nitrogênio líquido para a remoção da lamínula e secas ao ar. As lâminas foram então envelhecidas por três dias, tratadas com ácido acético 45% a 60°C por 10 min., lavadas com água corrente e seca ao ar. Em seguida foram tratadas com uma solução de hidróxido de bário a 5% a temperatura ambiente por 10 min., lavadas rapidamente em ácido acético 45% e depois lavadas em água corrente por 2 min, secas e incubadas em 2x SSC a 60°C por 80 minutos. Após esse tratamento, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e coradas com Giemsa a 5% por 10 min. e montadas em Entellan.

#### *Coloração com Nitrato de prata*

O bandeamento AgNOR seguiu Hizume et al. (1980), com algumas modificações. As lâminas foram confeccionadas de acordo com o bandeamento C. Em seguida foram colocadas algumas gotas de solução de nitrato de prata sobre a lâmina. As mesmas foram cobertas com uma lamínula de vidro. Após 20 minutos em câmara úmida a 60 °C, as lâminas foram lavadas em água destilada para montagem com Entellan.

#### *Documentação fotográfica e medições cromossômicas*

As melhores metáfases das análises através da coloração convencional foram fotografadas em microscópio Leica DMLB, usando o sistema de fotomicroscopia Leica wild MPS 48, enquanto as metáfases obtidas a partir do bandeamento foram capturadas em microscópio Leica DMLB equipada com câmera de vídeo CCD e o programa IM50. As medições cromossômicas foram feitas com o auxílio do programa Image Tool 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>), a partir das cinco melhores metáfases, que foram utilizadas para a construção dos idiogramas. O comprimento de cada par cromossômico corresponde à média aritmética obtida para todas as células analisadas. Os cromossomos foram classificados de acordo com a nomenclatura proposta por Guerra (1986) e Morawetz e Samuel (1988).

### **Resultados**

Todas as espécies apresentaram cariótipo assimétrico, núcleos interfásicos reticulados (Figs. 2a-j, 1l, 1m, 1o) e padrão de condensação profásico uniforme. Todavia, em *Limnobium laevigatum*, os núcleos interfásicos apresentaram regiões de cromatina mais

fortemente coradas intercaladas com regiões descoradas tendendo a um padrão semi-reticulado (Fig. 1p).

Na família Alismataceae, todas as espécies apresentaram  $2n=22$ , fórmula cariotípica  $2m+20a$  (Tabela 1) e elevada assimetria cariotípica, todas incluídas na categoria 3C de Stebbins (1971). O comprimento cromossômico variou de  $3,14\mu\text{m}$  nos menores cromossomos de *Echinodorus tenellus* (Fig. 1i) a  $13,54\mu\text{m}$  no par cromossômico maior de *E. paniculatus* (Fig. 1a). Para todas as espécies foram observadas constrições secundárias em dois pares cromossômicos acrocêntricos, geralmente com heteromorfismo para a distensão da RON em um dos homólogos (Figs. 2- a, c, d, e; 1a-1j). Neste caso, um cromossomo apresentou RON longamente distendida no braço curto, enquanto no seu homólogo esta não foi distendida ou não foi visualizada. Em *Echinodorus paniculatus* (Fig. 1a), *E. lanceolatus* (Fig. 1g) e *E. tenellus* (Fig. 1i-j), além da distensão incompleta em um dos homólogos, também ocorreu amplificação da RON. Esta amplificação foi confirmada para *E. tenellus* e *E. lanceolatus* após a impregnação com nitrato de prata que evidenciou quatro nucléolos ativos, um dos quais maior, e apenas três nas demais (resultados não mostrados).

Foram observadas bandas C/Giemsa na porção terminal do braço curto e nos satélites dos dois cromossomos acrocêntricos menores em todas as espécies de *Echinodorus* (Figs. 1- b, d, f, h, j), correspondendo as RONs visíveis (ou não) na coloração convencional. Em *E. paniculatus* e *E. tenellus*, também foi observada uma banda amplificada, correspondente ao satélite maior visualizado na coloração convencional (Figs. 1b e 1j). Entretanto, em *E. lanceolatus*, além das RONs heterocromáticas, observou-se bandas teloméricas nos braços longos de sete pares acrocêntricos, incluindo o par satelitado maior (Fig. 1h).

Em Limnocharitaceae, *Hydrocleys nymphoides* (Fig. 1l) e *H. martii* (Fig. 1m) apresentaram número cromossômico  $2n=16$ , com dois pares metacêntricos, um submetacêntrico e cinco acrocêntricos. Foi observada constrição secundária localizada no braço curto do par metacêntrico menor de *H. martii* e no braço curto de um dos menores pares acrocêntricos em *H. nymphoides*. Para o gênero *Limnocharis*, *L. flava* (Fig. 1n) e *L. laforestii* (Fig. 1o), o complemento cromossômico foi constituído por  $2n=20$ , sendo dois pares metacêntricos e oito pares acrocêntricos, sem constrições secundárias visíveis. Os tamanhos cromossômicos médios variaram de  $4,01$  e  $4,46\mu\text{m}$  para *Hydrocleys martii* e *H. nymphoides* e  $4,77$  e  $6,49\mu\text{m}$  para *Limnocharis flava* e *L. laforestii*, respectivamente. Assim

como na família Alismataceae, em Limnocharitaceae, os cariótipos foram claramente assimétricos e incluídos na categoria 3C de Stebbins (1971). A coloração com nitrato revelou dois nucléolos ativos nas espécies de *Hydrocleys* e quatro para *L. flava* (dados não mostrados).

Para a família Hydrocharitaceae, foram analisadas através da coloração convencional duas populações de *Limnobium laevigatum* (Fig. 1p), ambas com  $2n=28$ , medindo de 1.58 a 5.83 $\mu$ m, sendo quatro pares metacêntricos menores e os demais submetacêntricos e/ou acrocêntricos (Fig. 2f), dos quais, quatro pares maiores e seis menores. Assim como nas demais Alismatales, a espécie apresentou cariótipo assimétrico, porém incluída na categoria 2C de Stebbins (1971).

### Discussão

Das espécies analisadas, foram confirmadas as contagens prévias de  $2n=22$  para *Echinodorus grandiflorus* e *E. tenellus* (Costa et al. 2006),  $2n=16$  para *Hydrocleys nymphoides*,  $2n=20$  para *Limnocharis flava* e *L. laforestii* (Calligaris e Forni-Martins 2002) e  $2n=28$  para *Limnobium laevigatum*, como *Hydromystris laevigata* (Moscone e Bernardello 1985). Para as demais espécies não foram encontrados registros cromossômicos prévios. Em relação ao tipo de núcleo interfásico, todas as Alismataceae e Limnocharitaceae analisadas apresentaram núcleos reticulados, confirmando dados prévios para essas famílias (Costa e Forni-Martins 2003). Entretanto, *Limnobium laevigatum* divergiu das outras Alismatales por apresentar núcleos semi-reticulados e diferenças em número e morfologia cromossômica (Bernadello e Moscone 1986). Esses dados parecem corroborar a análise filogenética de Chen et al. (2004) que dispõem Hydrocharitaceae em um clado distinto de Alismataceae-Limnocharitaceae, diferindo destas por apresentar ovário sincárpico.

#### *Família Alismataceae*

A família Alismataceae é caracterizada por apresentar cromossomos grandes, com morfologia e números bastante estáveis dentro de um gênero, com  $2n=22$  na maioria das espécies, porém com uma variação desde  $2n=14$  em *Alisma* (Baldwin e Speese 1955),  $2n=22$  em *Echinodorus* e *Sagittaria*, e  $2n=3x=33$  em uma população triplóide de *Echinodorus tenellus* (Costa e Forni-Martins 2004). No presente trabalho, essa estabilidade numérica foi confirmada e todas as espécies apresentaram  $2n=22$ , sem ocorrência de populações poliplóides. Todavia, em relação aos tamanhos cromossômicos, os registros prévios para *E.*

*grandiflorus* do Sudeste do Brasil medindo 2,3 e 6,3 $\mu$ m (Costa e Forni-Martins 2003) divergiram dos nossos resultados para esta espécie, onde a média dos tamanhos cromossômicos variou de 6,6 a 12,9 $\mu$ m, o que corresponde a mais de duas vezes o tamanho cromossômico para a população do Sudeste. Entretanto, para *E. tenellus* os tamanhos cromossômicos previamente registrados foram mais coincidentes com os nossos dados. Para *E. grandiflorus* são reconhecidas duas subespécies, ambas registradas para as regiões Nordeste e Sudeste do Brasil (Haynes e Holm-Nielsen 1994). É provável, portanto, que a diferença nos tamanhos cromossômicos seja explicada por diferenças taxonômica infraespecíficas. As duas populações analisadas no presente trabalho foram incluídas na subespécie *grandiflorus*, mas não foi possível confirmar qual a subespécie do material estudado por Costa e Forni-Martins (2003). De acordo com Lehtonen (2005), *E. grandiflorus* é polifilético, tendo as diferentes subespécies sido distribuídas em diferentes ramos do cladograma. Assim, as diferenças cariotípicas observadas entre nossos dados e os de Costa e Forni-Martins (2003) suportam a hipótese de filogenia de Lehtonen (2006), indicando que pode tratar-se de espécies diferentes.

Com relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, tem ocorrido um padrão mais variável entre as espécies estudadas e os dados prévios da literatura. Nas espécies do Nordeste do Brasil foram observados quatro blocos heterocromáticos relacionados à RON e localizados nos braços curtos de dois pares acrocêntricos menores em quatro das cinco espécies estudadas, exceto para *Echinodorus lanceolatus*, que além das RONs heterocromáticas, apresentou bandas terminais nos braços longos de sete pares acrocêntricos. Nesse aspecto, as populações do NE também divergiram das populações do Sudeste de *E. grandiflorus* e *E. tenellus*. Em nosso trabalho, as duas populações de *E. grandiflorus* apresentaram quatro bandas, enquanto a população estudada por Costa et al. (2006) apresentou apenas duas. Já a única população estudada de *E. tenellus* apresentou quatro bandas, enquanto Costa e Forni-Martins (2004) observaram uma única banda em uma população diplóide e duas na população triplóide. Diferentes padrões de distribuição de heterocromatina em plantas são freqüentes e pode ocorrer na mesma espécie (revisado por Guerra 2000) e tem sido observado em *Alstroemeria* (Buitendijk e Ramanna 1996).

Das espécies analisadas, *Echinodorus tenellus* se distinguiu claramente das outras espécies por apresentar hábito de crescimento menor e presença de folhas submersas, enquanto as demais espécies são maiores, e não possuem esse tipo de folha (Haynes e Holm-Nielsen 1994). Contudo, não foi observada nenhuma diferença cariotípica marcante entre o

padrão de bandas C de *E. tenellus* e as outras espécies estudadas. Uma notável exceção ocorreu em *E. lanceolatus* que divergiu das demais espécies por apresentar, além das bandas correspondentes às RONS heterocromáticas, bandas terminais nos braços longos de sete pares acrocêntricos (Fig. 1h). Um padrão ainda mais variável foi observado por Costa et al. (2006) em duas outras espécies, que além das bandas terminais, observou bandas intersticiais nos braços longos de sete pares acrocêntricos de *E. longipetalus*, e bandas terminais e intersticiais em *E. macrophyllus*. Essa variabilidade no padrão de bandas de *Echinodorus* poderá ser útil em outros trabalhos de citotaxonomia do gênero, especialmente na identificação de híbridos interespecíficos entre espécies com diferentes padrões de bandas. No caso de *E. lanceolatus*, *E. macrophyllus* e *E. longipetalus*, o padrão de bandas semelhantes (terminais) e intermediários (intersticiais), indica a possibilidade de hibridização entre um ancestral com padrão semelhante a *E. lanceolatus* e *E. longipetalus*, com perda ou ganho de algumas bandas (ver esquema na Fig. 2). Ambas as espécies, compartilham caracteres morfológicos como poucas flores, ausência de marcas pelúcidas, numerosos carpelos, folhas lanceoladas e distribuição geográfica comum. Essas duas últimas foram dispostas em diferentes ramos do clado A de Lehtonen (2006), enquanto todas as subespécies de *E. macrophyllus* foram incluídas no clado B, porém em uma condição derivada, suportando a hipótese da origem híbrida desta última.

Estudos morfológicos no gênero apontam uma origem polifilética para *Echinodorus*, onde o subgênero *Helianthium* estaria mais relacionado ao gênero *Sagittaria* do que as demais espécies de *Echinodorus* (Lehtonen 2006). Os dados cariológicos atualmente disponíveis para esses dois gêneros, indicam que eles são bastante semelhantes em termos cariotípicos. Assim como as demais espécies de *Echinodorus*, *Sagittaria* apresenta  $2n=22$  e fórmula cariotípica  $2m+20a$  ou  $2m+2sm+18a$  (Costa e Forni-Martins 2003), ou ainda  $4m+18a$  (Baldwin e Speese 1955).

#### *Família Limnocharitaceae*

Em relação às Limnocharitaceae, os registros de  $2n=16$  para *Hydrocleys martii* e *H. nymphoides* e de  $2n=20$  para *Limnocharis flava* e *L. laforestii*, confirmam os números básicos anteriormente propostos para esses gêneros. Para *H. martii*, a contagem é inédita e o cariótipo é bastante similar a *H. nymphoides*, diferindo basicamente na localização do satélite, observado no menor par metacêntrico na primeira espécie, enquanto na segunda, ocorreu no menor par acrocêntrico. Contudo, no registro prévio de Forni-Martins e Calligaris

(2002), o satélite de *H. nymphoides* foi observado no braço curto do par metacêntrico intermediário. Constrições secundárias constituem um parâmetro cromossômico bastante variável em plantas e podem ou não serem expressas na célula (Guerra 2000). Entretanto, na família Limnocharitaceae, assim como em Alismataceae, embora com algumas variações na primeira, as constrições secundárias têm uma localização preferencial, geralmente nos braços curtos dos menores acrocêntricos. O número  $2n=16$  tem sido reportado para todas as espécies de *Hydrocleys* analisadas, exceto para *H. modesta* com  $2n=14$  (Kenton 1981), neste caso, aparentemente  $2n=14$  seria derivado e teria se originado por fusão cêntrica com perda de um fragmento cêntrico e tornada homozigota através da segregação na meiose. De acordo com a autora, também seria possível que a condição derivada esteja no cariótipo com  $2n=16$  originado por fissão cêntrica, suportando a hipótese de um número básico ancestral  $x=6$  para a família como um todo (Costa e Forni-Martins 2003). Em relação à *Limnocharis*, o registro de  $2n=20$  e fórmula cariotípica  $4m+16a$  apresenta uma posição intermediária entre *Echinodorus* e *Hydrocleys*, corroborando dados moleculares que incluem *Limnocharis* em uma politomia com *Sagittaria* e *Echinodorus* (Chen et al. 2004).

#### *Família Hydrocharitaceae*

Em Hydrocharitaceae, *Limnobium laevigatum*, o único representante estudado no presente trabalho, apresentou cariótipo claramente diferente de Alismataceae e Limnocharitaceae. Foram observados  $2n=28$  e fórmula cariotípica  $4m+6sm+4a$ , confirmando o número e a fórmula cariotípica anteriormente reportados para esta espécie (Moscone e Bernardello 1985). Os dados cromossômicos deste trabalho e da literatura, não permitem inferir para Hydrocharitaceae, diferentemente de Alismataceae e Limnocharitaceae, a provável rota de evolução numérica para esta família. Para as Hydrocharitaceae, os registros cromossômicos são escassos, restritos ao número cromossômico que são bastante variáveis, de  $2n=14$  em *Hydrocharis morus-ranae* a  $2n=88$  em *Ottelia alismoides* (Goldblatt 1981). Esses números são difíceis de serem associados a um número básico único, sendo necessário um aumento no conhecimento cromossômico da família para que se tenha uma idéia mais clara de sua evolução cariotípica.

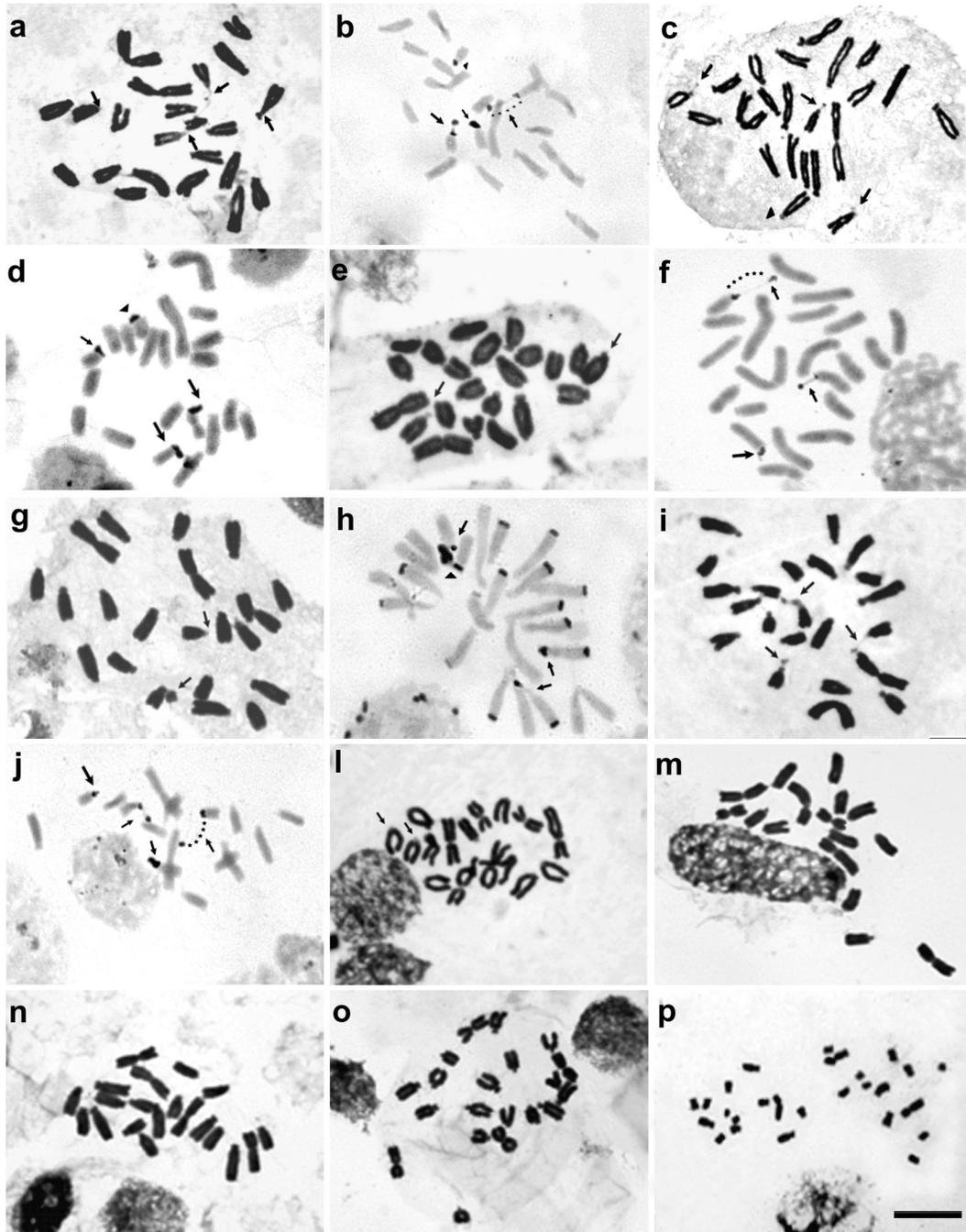
#### **Agradecimentos**

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ao PELD (Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração), pelo suporte financeiro nas viagens de coleta.

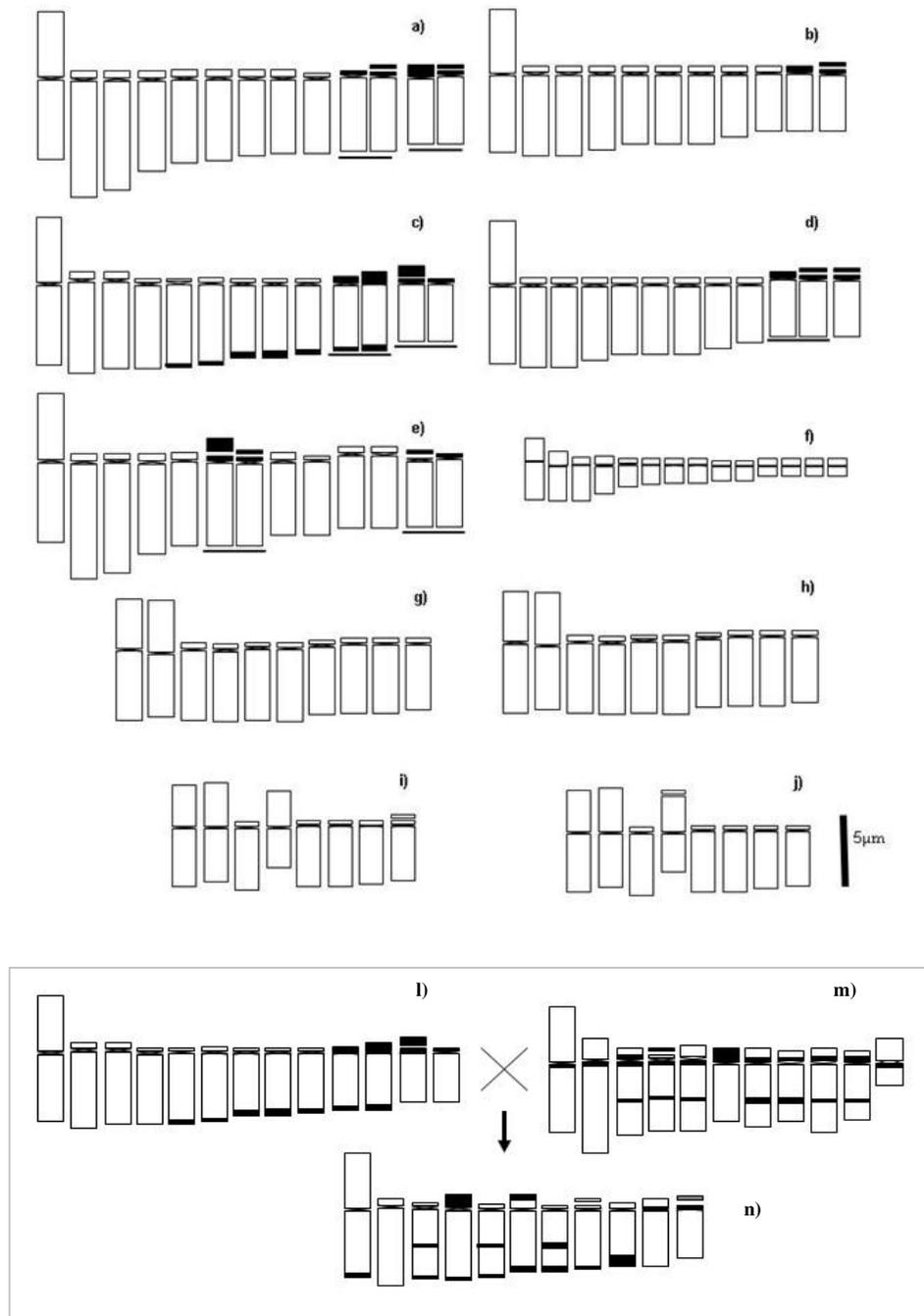
**Tab. 1.** Relação das espécies estudadas de Alismatales, material estudado, proveniência, números cromossômicos observados, contagens prévias, fórmula cariotípica e distribuição da heterocromatina.

Famílias/ Espécies	Figs.	Proveniência	Coletor/número	2n	CP	Referências	FC	MMMC	DH
<b>Alismataceae</b>									
<i>Echinodorus paniculatus</i> Micheli	1a, b	Campo Maior, PI	L.P.Felix, 10826	<b>22</b>	—	—	2m+20a	4,37 a 13,54 µm	1bpa+ 1bpp + 2bpd
		Areia, PB	L.P.Felix, 10825	<b>22</b>	—	—	2m+20a		
<i>E. grandiflorus</i> (Cham & Schldtl.) Micheli	1c, d	Cachoeira do Urubu, CE	L.P.Felix, 10823	<b>22</b>	2n=22	Costa & Forni-Martins (2003)	2m+20a	6,58 a 12,91µm	1bpa+ 1bpp + 2bpd
		Itaporoca, PB	L.P.Felix, 10824	<b>22</b>	2n=22	Costa & Forni-Martins (2003)	2m+20a		
<i>E. andrieuxii</i> (Hook & Arnott)	1e, f								
Haynes & Holm-Nielsen		Campo Maior, PI	L.P.Felix, 10821	<b>22</b>	—	—	2m+20a	3,43 a 11,2µm	2bpp + 2bpd
<i>E. lanceolatus</i> Rataj	1g, h	Rio Grande do Sul, RS	L.P.Felix, 10822	<b>22</b>	—	—	2m+20a	4,36 a 11,0µm	12btt+1bpa+ 3bpp
<i>E. tenellus</i> (Mart. ex. Schult) Buchenau	1i, j	Campo Maior, PI	L.P.Felix, 10543	<b>22</b>	2n=22  2n=33	Costa & Forni Martins (2004)  Costa et al. (2006)	2m+20a	3,14 a 9,66 µm	1bpa+ 1bpp + 2bpd
<b>Limnocharitaceae</b>									
<i>Hydrocleys nymphoides</i> (Willd) Buchenau	1l	Areia, PB	L.P.Felix, S/N	<b>16</b>	2n=16	Calligaris & Forni-Martins (2002)	2sm+4m+10a	3,7 a 7,81 µm	—
<i>Hydrocleys martii</i> Seubert	1m	Esperança, PB	L.P.Felix, 10760	<b>16</b>	—	—	2sm+4m+10a	2,85 a 6,91 µm	—
<i>Limnocharis flava</i> (L.) Buchenau	1n	Recife, PE	L.P.Felix, 11281	<b>20</b>	2n=20	Calligaris & Forni-Martins (2002)	4m+16a	3,61 a 6,74 µm	—
<i>Limnocharis laforestii</i> Griseb.	1o	Areia, PB	L.P.Felix, S/N	<b>20</b>	2n=20	Calligaris & Forni-Martins (2002)	4m+16a	4,77 a 8,9 µm	—
<b>Hydrocharitaceae</b>									
<i>Limnobium laevigatum</i> (Humb. & Bonpl. ex. Willd.)	1p	Areia, PB	L.P.Felix, 10765	<b>28</b>	2n=28	Bernadello & Moscone 1985	4m+6sm+4a	1,58 a 5,83 µm	—

**Figs:** Figuras, **2n:** número cromossômico somático; **CP:** Contagens prévias; **FC:** Fórmula Cariotípica; **MMMC:** Média do menor e do maior cromossomo; **DH:** Distribuição da Heterocromatina (**bpa:** bloco proximal amplificado; **bpp:** bloco proximal pequeno; **bpd:** bloco proximal distendido; **btt:** bloco terminal telomérico).



**Fig. 1.** Coloração com Giemsa em espécies de Alismatales (incluindo bandeamento C para os *Echinodorus* analisados). *E. paniculatus* (a, b); *E. grandiflorus* (c, d). *E. andrieuxii* (e, f); *E. lanceolatus* (g, h); *E. tenellus* (i, j); *Hydrocleys nymphoides* (l); *H. martii* (m); *L. flava* (n); *L. laforestii* (o); *Limnobium laevigatum* (p). Em b, c, d cabeças de setas indicam satélite pequeno e em h indica satélite amplificado. Setas indicam satélites correspondentes as RONS heterocromáticas evidenciadas pelo bandeamento C. Bar = 10  $\mu$ m



**Fig.2** - Idiograma de algumas espécies de Alismatales. a) *Echinodorus paniculatus* (n=11), b) *E. andrieuxii* (n=11), c) *E.lanceolatus* (n=11), d) *E. grandiflorus*, e) *E. tenellus* (n=11), f) *Limnobiium laevigatum* (n=14), g) *Limnocharis flava* (n=10), h) *L. laforestii* (n=10), i) *Hydrocleys nymphoides* (n=8) e j) *H. martii* (n=8). Barra horizontal em a, c, d e e mostram pares heteromórficos para distensão das RONS heterocromáticas visualizadas pelo bandejamento C. No quadro, representação esquemática da hipótese em que *E. lanceolatus* (l) e *E. longipetalus* (m) originaram o possível híbrido *E. macrophyllus* (n).

## Referências Bibliográficas

- Angiosperm Phylogeny Group. (1998) In ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 85:531-553.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141:399-436.
- Baldwin J. T. Jr., Speese B. M. (1955) Chromosomes of Taxa of the Alismataceae in the Range of Gray's Manual. *American Journal of Botany*. 42: 406-411.
- Bernadello L. M., Moscone E. (1986) The Karyotype of *Limnobium Spongia* (Hydrocharitaceae). *Plant Systematics and Evol.* 153: 31-36.
- Bhattacharya G.N. Grosh D. K. (1977) Cytological analysis of diferent cytotypes of *Ottelia Alismoides* Pers. *Caryologia* 29: 195-202.
- Buitendijk J. H. Ramanna M. S. (1996) Giemsa C-banded Karyotypes of Eight Species of *Alstroemeria* L. and Some of Their Hybrids. *Ann. of Bot.* 78: 449-457.
- Chase M. W., Soltis De, Soltis P. S., Rudall P.J., Fay M.F., Hahn W. H., Sullivan S., Joseph J., Molvray M., Kores P. J., Givnish T. J., Sytsma K. J., Pires J. C. (2000) Higher-level systematics of the monocotyledons: An assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson Kl, Morrison Da, Eds. *Monocots: Systematics and Evolution*. Melbourne: Csiro. 3–16.
- Chaudhuri J. B., Sharma A. (1978) Cytological studies on three aquatic members of Hydrocharitaceae in relation to their morphological and ecological characteristics. *Cytologia*. 42: 723-729.
- Chen J. M., Chen D., Robert W., Wang G. F., Guo YH (2004) Evolution of apocarpy in Alismatidae using phylogenetic evidence from chloroplast *rbcL* gene sequence data. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:33-40.
- Costa Y. J., Forni-Martins E. R. (2003) Karyology of some Brazilian species of Alismataceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*.143:159-164.
- Costa Y. J., Forni-Martins E. R. (2004) A triploid cytotype of *Echinodorus Tenellus*. *Aquatic Botany*.79: 325-332.
- Costa Y. J., Forni-Martins E. R., Vanzela, A. L. L. (2006) Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismatales) with chromosomal banding and 45s DNAr FiSH. *Plant Systematics and Evolution*. 257: 119-127.

- Cronquist A. (1981) An integrated system of classification of flowering plants. New York, Springer - Verlag.
- Cronquist A. (1988) The Evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden.
- Dahlgren R. M. T., Bremer K. (1985) Major clades of the angiosperms. *Cladistics*. 1:349-368.
- Forni-Martins E. R., Calligaris K. P. (2002) Chromosomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany*. 74: 33-41.
- Fotadar J. L., Roy S. K. (1974) Biosystematic of some Indian. In Hydrocharitaceae with notes on the evolutionary status of its members. In P. Kachroo (Ed.) *Adv. Front. Cytogenet.* 357-364. Hindustan Public., Dehli.
- Goldblatt P. (1981) Index to plant chromosomal number. Missouri Botanical Garden.
- Guerra M. (1983) O Uso Giemsa na citogenética vegetal - Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo-Brasil. 35: 190-193.
- Guerra M. (1986) Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Rev. Bras Genet.* 9: 741-743.
- Guerra M. (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1029-1041.
- Harada I. (1956) Cytological studies In Helobiae. Part I. Numbers in seven families. *Cytologia*. 21: 306-328.
- Haynes R. R., Holm-Nielsen L. B. (1992) The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica*. Monograph 62. The New York Botanical Garden, New York.
- Haynes R. R., Holm - Nielsen L. B. (1994) The Alismataceae. *Flora Neotropica*, Monograph 64. New York: The New York Botanical Garden.
- Hizume M., Sato S., Tanaka A. (1980) A Highly reproducible method for nucleolus organizing regions staining in Plants, *Stain Technol.* 55: 87-90.
- Hutchinson J. (1959) The families of flowering plants. 2 Ed. Clarendon Press, Oxford.
- Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F. (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sunderland, Ma: Sinauer Associates.
- Kenton A. (1981) A Robertsonian Relationship in the chromosomes of two species of Hydrocleys. *Kew Bull* 36: 487-492.

- Lehtonen S. (2006) Phylogenetics of *Echinodorus* (Alismataceae) based on morphological data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 150: 291-305.
- Les D. H., Schneider E. L., (1995) The Nymphaeales, Al- *Lacandonia Schismatica* (Lacandoniaceae). *Annals of the Alismatidae and the theory of an aquatic monocotyledon Missouri Botanical Garden* 76: 124–127.
- Morawetz W., Samuel M. R. A. (1988) Karyological patterns in the Hamamelidae. In: Crane, P.;Blackmore, S. *Evolution, Systematics and Fossil History of the Hamamelidae*. Oxford: Clarendon Press. 40a, 129-154.
- Moscone E. A., Bernadello L.M. (1985) Chromosome studies on *Hydromystria Laevigatum* (Hydrocharitaceae) *Ann. Missouri Botanical Garden* 72: 480-484.
- Packer J. G., and Witkus R. (1982). In IOBP Chromosome Number Reports Lxxv. A. Löve, Ed, *Taxon* 31:342–368.
- Schwarzarcher T., Ambros P., Schweizer D (1980) Application of Giemsa Banding to Orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evol.* 134: 293-297.
- Sharma A. K., Chatterjee M. T. (1967) Cytotaxonomy of Helobieae with special reference to the mode of evolution. *Cytologia* 32: 286–307.
- Souza V. C., Lorenzi H. (2005) *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II*.
- Stebbins G. L. (1971) *Chromosomal Evolution in Higher Plants* – London. 216p.
- Tamura M. N., Yamashita J., Fuse S., Haraguchi M. (2004) Molecular phylogeny of monocotyledons inferred from combined analysis of plastid matK and rbcL gene sequences. *Journal Plant Research, London* 117: 109-120.

## CAPITULO II

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA:  
**GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

## Citogenética de Alismataceae e Limnocharitaceae: bandeamento CMA/DAPI e FISH do DNAr 45S

Lidiane L. Feitoza<sup>1</sup>, Maria Isabel G. Martins<sup>1</sup>, Leonardo P. Felix<sup>2</sup>, Reginaldo Carvalho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética - Bioquímica e Sequenciamento de DNA. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco, Brasil. CNPq

<sup>2</sup> Laboratório de Citogenética Vegetal. Universidade Federal da Paraíba. Paraíba, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Biologia/Genética. Laboratório de Genética - Bioquímica e Sequenciamento de DNA. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

### Resumo

Espécies pertencentes às famílias Alismataceae (*Echinodorus*) e Limnocharitaceae (*Hydrocleys* e *Limnocharis*) foram analisadas através do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e hibridização *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 45S. Todas as espécies de *Echinodorus* apresentaram  $2n=22$ , cariótipo bimodal e heterocromatina rica em GC localizada preferencialmente em dois pares acrocêntricos menores que em geral corresponderam ao número de sítios de DNAr 45S, exceto *E. lanceolatus* que teve bandas DAPI<sup>+</sup>. Um padrão de bandas semelhante foi observado nas duas espécies de *Limnocharis* ( $2n=20$ ), que entretanto, diferiu em relação aos sítios de DNAr 45S em *L. laforestii*, que foram apenas dois. As espécies *Hydrocleys nymphoides* e *H. martii* apresentaram número cromossômico  $2n=16$ , mas tiveram a posição da heterocromatina rica em GC associada ao satélite em tipos cromossômicos diferentes. São discutidas as implicações citotaxonômicas desses padrões e correlacionados com dados prévios da literatura.

**Palavras-chave:** heterocromatina, fluorocromos, FISH, evolução

## Introdução

As Alismatales constituem uma ordem de plantas de hábitat aquático, ou semi-aquático, terrestres e epífitas. Compreendem um total de 14 famílias (APG I, 1998; Chase *et al.*, 2000; APG II, 2003), das quais, oito (Araceae, Hydrocharitaceae, Alismataceae, Limnocharitaceae, Juncaginaceae, Ruppiaceae, Cymodoceae e Potamogetonaceae) ocorrem no Brasil (Souza e Lorenzi, 2005). Destas, as famílias Alismataceae e Limnocharitaceae, têm no Nordeste do Brasil um dos seus principais centros de diversidade (Haynes e Holm-Nielsen, 1992; 1994). Muitas de suas espécies apresentam importância medicinal (Buznego e Pérez-Saad, 2006), entretanto são especialmente reconhecidas pela sua história evolutiva e delimitação taxonômica complexa.

De acordo com alguns autores, as famílias Alismataceae e Limnocharitaceae compartilham de muitos caracteres morfológicos semelhantes, e por isso, deveriam ser reduzidas a apenas uma família. Esse ponto de vista é adotado por Dahlgren e Clifford (1981) com base em dados morfológicos e por Judd *et al.* (1999) utilizando sequências do gene *rbcL*. Dados cariológicos reforçam essa hipótese, devido a uma possível rota evolutiva comum compartilhada por essas duas linhagens, Alismataceae e Limnocharitaceae, com base em um cariótipo ancestral simétrico com  $n=6$  cromossomos metacêntricos. Esse cariótipo ancestral teria sofrido sucessivas fissões cêntricas do tipo Robertsoniana, originando cromossomos acrocêntricos observados em ambas as famílias (Forni-Martins e Calligaris, 2002; Costa e Forni-Martins, 2003). Mais recentemente, dados moleculares com base em sequências de DNA do gene *rbcL* para 46 espécies representando 15 famílias de Alismatideae indicam que a inclusão de Limnocharitaceae em Alismataceae tornaria esta última monofilética (Chen *et al.*, 2004).

Para os táxons brasileiros, há registros cariológicos para número e morfologia cromossômica em alguns representantes de Alismataceae pertencentes aos gêneros *Echinodorus* e *Sagittaria* (Costa e Forni-Martins, 2003) e para dois gêneros pertencentes a Limnocharitaceae, *Limnocharis* e *Hydrocleys* (Forni-Martins e Calligaris, 2002). Em relação às Limnocharitaceae, tem sido identificados os números básicos  $x=7$  para *Butomopsis*,  $x=7$  ou 8 para *Hydrocleys* e  $x=10$  para *Limnocharis* (Harada, 1956).

A informação citogenética através da combinação do bandeamento cromossômico e FISH pode ser usada para comparar espécies do mesmo gênero, gêneros relacionados e espécies de diferentes gêneros, permitindo um melhor detalhamento do cariótipo (Guerra,

2004). Em Alismataceae, bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI e hibridização *in situ* com DNAr 45S são conhecidos, até então, apenas para cinco espécies de *Echinodorus* do Brasil: *E. grandiflorus*, *E. bolivianus*, *E. longipetalus*, *E. macrophyllus* e *E. tenellus* (Costa *et al.*, 2006). Para as Limnocharitaceae, não há registro na literatura de estudos envolvendo bandeamento com fluorocromos e hibridização com o DNAr, o que dificulta uma compreensão mais clara da evolução cariotípica nesse grupo de plantas.

Nesse trabalho foram estudadas citologicamente através do bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI e da localização dos sítios de DNAr 45S, cinco espécies da família Alismataceae e quatro de Limnocharitaceae ocorrentes no Nordeste do Brasil. Em Alismataceae, uma exceção foi *Echinodorus lanceolatus*, proveniente do estado do Rio grande do Sul. Assim, objetivou-se caracterizar mais detalhadamente o cariótipo dessas espécies através do mapeamento físico dos sítios heterocromáticos GC/AT e de DNAr 45S, e assim compreender a evolução cariotípica nessas famílias.

## **Materiais e Métodos**

Foram analisadas um total de nove espécies de Alismatales, sendo quatro (*Hydrocleys nymphoides*, *H. martii*, *Limnocharis flava* e *L. laforestii*) da família Limnocharitaceae, e cinco (*Echinodorus paniculatus*, *E. grandiflorus* subsp. *grandiflorus*, *E. andrieuxii*, *E. lanceolatus* e *E. tenellus*) da família Alismataceae. Para as espécies foram realizados o bandeamento direto com os fluorocromos CMA e DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e hibridação fluorescente *in situ* com sondas de DNAr 45S. Os espécimes foram coletados nos estados da Paraíba, Pernambuco, Ceará, Piauí e Rio Grande do Sul. As exsiccatas estão depositadas no Herbário Jayme Coelho de Moraes, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba.

### *Preparação Cromossômica*

Para as análises mitóticas, pontas de raízes obtidas de plantas adultas cultivadas em jarros foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (0,002M) 16h a 15°C, fixadas em 3:1 etanol-ácido acético (v/v) por 4 h à temperatura ambiente e estocadas em *freezer* a -20°C. O material foi lavado em água destilada e digerido em uma solução enzimática (2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v) por 1h a 37°C. Em seguida as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em uma gota de ácido acético 45%, e as lamínulas

retiradas em nitrogênio líquido. As lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente.

#### *Coloração com fluorocromos CMA/DAPI*

O protocolo seguido foi o de Schweizer (1976), com pequenas modificações. Após o envelhecimento por três dias, o material vegetal foi corado com CMA (cromomicina A<sub>3</sub>) por 40min e com DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole (DAPI) por 30min, posteriormente montadas em McIlvaine-glicerol (1:1, v/v). A documentação fotográfica foi obtida com câmera digital Cyber-Shot (Sony) 5.1 MP utilizando-se 2.1 MP de resolução, acoplada a um microscópio de epifluorescência DMLB (Leica). As imagens foram trabalhadas no programa Corel PHOTO POINT 10.

#### *Bandeamento C-CMA-DAPI*

O procedimento para banda C foi baseado em Schwarzacher *et al.* (1980) com pequenas modificações e foi empregado para todas as espécies estudadas, objetivando confirmar a constituição dos blocos de heterocromatina. As raízes foram digeridas em solução enzimática conforme protocolo para digestão para fluorocromos. Depois de envelhecidas por três dias, as lâminas foram tratadas com uma solução de hidróxido de bário a 5% a temperatura ambiente por 10 min, lavadas rapidamente em ácido acético 45% e depois em água corrente por 2 min, secas e incubadas em 2x SSC a 60°C por 80min, com exceção de *Hydrocleys* e *Limnocharis* em que o tempo foi reduzido para 45min. Após esse tratamento, as lâminas foram lavadas em água destilada, secas e coradas com CMA/DAPI de acordo com o protocolo de coloração com os fluorocromos.

#### *Hibridização in situ por fluorescência*

As melhores lâminas foram submetidas ao processo de FISH de acordo com Moscone *et al.* (1996), com modificações. A técnica de hibridização *in situ* envolveu a preparação de sonda específica de DNA ribossomal 45S. A sonda utilizada de *Arabidops thaliana* foi marcada com digoxigenina 11-dUTP. As lâminas contendo as preparações citológicas foram tratadas com fixador Carnoy (3:1) e submetidas a uma série alcoólica. Em seguida foram desnaturadas a 75 °C em formamida 60% por 7 min. A desnaturação da sonda ocorreu também a 75 °C durante 10 min. Depois de desnaturadas com a sonda marcada, as lâminas foram transferidas para uma câmara úmida pré-aquecida a 37 °C ficando *overnight* para

hibridizar. Os sítios de DNAr 45S foram detectados com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-biotina (Dako) ou anticorpo primário anti-digoxigenina produzido em ovelha conjugado ao FITC (Roche) e visualizados com um anticorpo secundário conjugado ao tetrametil rodamina – isotiocianato (TRITC) (Dako), ou, com anticorpo secundário de ovelha produzido em coelho e conjugado com FITC (Dako) respectivamente. As lâminas foram montadas com DAPI (2 µg/mL) / Vectashield. Utilizou-se um fotomicroscópio Leica DMRB, equipado com luz ultravioleta e câmera de vídeo DC 300F da Leica para captura das imagens as quais foram processadas no programa Image Manager 50.

## Resultados

A lista das espécies estudadas, seus respectivos locais de coleta, número cromossômico e características cariomorfológicas estão presentes na tabela 1. Todas as espécies do gênero *Echinodorus* apresentaram número cromossômico  $2n=22$  (Tabela 1) e elevada assimetria cariotípica (fórmula cariotípica  $2m+20a$ ) (Figura 1). Cariótipos assimétricos também foram observados nas duas espécies estudadas de *Limnocharis*, com  $2n=20$  ( $4m+16a$ ) e de *Hydrocleys*, com  $2n=16$  ( $4m+2sm+10a$ ).

Foram observadas algumas diferenças na quantidade e localização da heterocromatina constitutiva entre as espécies analisadas. Para o gênero *Echinodorus*, as bandas  $CMA^+$  corresponderam em geral aos blocos  $C/CMA^+$  das RONS heterocromáticas, exceto em *E. lanceolatus* que além destas, apresentou bandas  $DAPI^+$  teloméricas em sete pares acrocêntricos, as quais só foram visualizadas após tratamento das lâminas para bandeamento C seguido da coloração com os fluorocromos (Figura 1). Após a hibridização *in situ*, constatou-se que de uma maneira geral as RONS heterocromáticas  $CMA^+$  corresponderam aos sítios de DNAr 45S, exceto em *E. andrieuxii*.

Em *Echinodorus paniculatus* foram observados nos braços curtos de dois pares acrocêntricos, duas bandas  $CMA^+/DAPI$  (Figuras 2A-B), as quais colocalizaram com quatro sítios de DNAr 45S, sendo dois maiores e dois menores, sempre com uma constrição secundária observada em apenas um dos homólogos (Figura 2C). Esse mesmo padrão de bandas fluorescentes e de distribuição dos sítios de DNAr 45S também foi observado em *E. grandiflorus* subsp. *grandiflorus* (Figuras 2I-J). Nas duas espécies, esse mesmo padrão de bandas foi observado após o tratamento para banda  $C/CMA/DAPI$ .

*Echinodorus lanceolatus* teve um padrão de banda diferente das demais espécies. Na coloração direta  $CMA/DAPI$  foram observados quatro blocos  $CMA^+/DAPI$  no braço curto de dois pares acrocêntricos (Figura 2D, setas), que foram fortemente heteromórficos. No par

menor (Figura 2D, setas vermelhas), um dos cromossomos apresentou bloco CMA bastante amplificado e distendido, em relação ao seu homólogo. O mesmo não foi observado em relação ao par maior, (Figura 2D, setas brancas), embora um dos homólogos tenha apresentado também um bloco maior. Após o bandeamento C/CMA/DAPI, as bandas CMA<sup>+</sup> foram observadas como DAPI<sup>+</sup> (Figura 2E, setas brancas) ou DAPI<sup>0</sup> (Figura 2E, cabeça de seta). Além destas foram observados 14 blocos DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup>, na região telomérica dos braços longos de sete pares acrocêntricos (Figura 2E, setas vermelhas). Após a hibridização *in situ*, essas bandas também foram claramente visualizadas (Figura 2F). Os quatro sítios de DNAr 45S coincidiram com as bandas CMA<sup>+</sup>. *Echinodoros andrieuxii*, também apresentou dois pares acrocêntricos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, que também foram heteromórficos, com um bloco CMA<sup>+</sup> distendido em um dos homólogos de cada par bandeado (Figura 2L, setas). Esse mesmo padrão de bandas foi observado pelo bandeamento C/CMA/DAPI (dados não mostrados). Todavia, só foram observados três sítios de DNAr 45S (Figura 2M).

Em *Echinodoros tenellus* foram observados quatro blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Figura 2G) nos satélites de dois pares acrocêntricos, os quais também foram heteromórficos para a distensão da banda CMA<sup>+</sup>. No par menor, um dos homólogos apresentou um bloco distendido e amplificado e o outro não (Figura 2G, setas brancas) e no par maior, as duas bandas foram distendidas, mas apenas uma foi amplificada (Figura 2G, setas vermelhas). Esse padrão de bandas não coincidiu com o bandeamento C/CMA/DAPI, que evidenciou dois blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> e dois blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (dados não mostrados). A hibridização *in situ* revelou quatro sítios de DNAr 45S, que também corresponderam aos blocos CMA<sup>+</sup> (Figura 2H).

Em *Limnocharis*, foram observados quatro blocos CMA<sup>+</sup>, nos braços curtos de dois pares acrocêntricos, sendo os quatro blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> em *Limnocharis flava* (Figura 3A-B). Entretanto, em *L. laforestii*, dos quatro blocos CMA<sup>+</sup>, dois foram DAPI<sup>+</sup> e dois DAPI<sup>0</sup> (Figura 3D-E). Nas duas espécies, esse mesmo padrão foi observado através do bandeamento C/CMA/DAPI. Ver em *L. laforestii* (Figura 3F). Não foram observados blocos DAPI<sup>+</sup> em nenhuma das duas espécies estudadas de *Limnocharis*. Em *L. flava*, foram visualizados quatro sítios de DNAr 45S correspondentes às bandas CMA<sup>+</sup> (Figura 3C, setas) enquanto em *L. laforestii*, apenas dois sítios foram claramente observados (Figura 4I, setas).

*Hydrocleys martii* apresentou dois blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> localizados nos braços curtos do menor par metacêntrico (Figura 3G-H). Em *H. nymphoides* também observou-se dois blocos CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>, porém localizados no braço curto do menor par acrocêntrico (Figura

3J-L). Em ambas as espécies, o bandeamento C/CMA/DAPI evidenciou idêntico padrão de bandas. Em *H. nymphoides*, os sítios de DNAr 45S corresponderam aos blocos CMA<sup>+</sup> (Figura 3M).

## Discussão

Em Alismatales de maneira geral, os estudos citogenéticos têm sido limitados à utilização da coloração convencional (Baldwin e Speese, 1955; Forni-Martins e Calligaris, 2002; Costa e Forni-Martins, 2003). O primeiro estudo empregando bandeamento cromossômico C foi realizado no gênero *Hydrocleys* por Kenton (1981). Posteriormente, Costa e Forni-Martins (2004) e Costa *et al.* (2006), além do bandeamento C, utilizaram coloração com fluorocromos e hibridização *in situ* com DNAr 45S em cinco espécies do gênero *Echinodorus*. Uma característica observada nesses trabalhos e aqui confirmada é a presença de heterocromatina constitutiva localizada nos braços curtos dos cromossomos onde a constrição secundária foi visualizada. No presente trabalho, essa RON heterocromática foi sempre CMA<sup>+</sup> e, no geral, corresponderam aos sítios de DNAr 45S. Apesar de algumas semelhanças observadas, nossos dados confirmam apenas parcialmente os dados de Costa *et al.* (2006) para três espécies de *Echinodorus* do Sudeste Brasil. Esses autores também observaram uma correspondência entre os sítios e as constrições secundárias para todas as espécies estudadas. Porém *E. grandiflorus* apresentou duas bandas CMA<sup>+</sup> que corresponderam a dois sítios de DNAr, enquanto *E. tenellus* apresentou apenas uma banda CMA<sup>+</sup> (Costa e Forni-Martins, 2004), embora tenham sido observados três sítios DNAr para esta espécie. Em nosso estudo, essas e as demais espécies apresentaram quatro sítios DNAr correspondentes às bandas CMA<sup>+</sup>, exceto *E. andrieuxii* que teve quatro bandas CMA<sup>+</sup> e apenas três sítios de DNAr 45S. Diferenças intraespecíficas no arranjo e na quantidade de heterocromatina ocorrem em vários gêneros, e tem sido usado para compreender a evolução cariotípica e sistemática em diversos grupos de plantas (revisado por Guerra, 2000). Em *Citrus*, por exemplo, as diferenças nos padrões de bandas CMA<sup>+</sup> e o elevado heteromorfismo cromossômico, têm sido relacionados à intensa hibridização interespecífica nesse taxon (Yamamoto e Tominaga, 2003). Além disso, outras populações de Alismataceae (gênero *Sagittaria*) da Região Sudeste (E. R. Forni-Martins, comunicação pessoal) têm apresentado variações no número de sítios de DNAr 45S. No presente trabalho, as duas únicas espécies onde mais de uma população foi analisada, observou-se o mesmo padrão de bandas heterocromáticas e sítios de DNAr 45S. Embora não seja possível

identificar com segurança a causa da variação intraespecífica nas populações do Sudeste, o registro de populações triplóides nessa região para *E. tenellus* (Costa e Forni-Martins, 2004) sugere uma maior diversidade cariotípica intraespecífica de Alismataceae nesta região. No caso de *E. grandiflorus* e *E. tenellus*, as diferenças encontradas entre o presente trabalho e os anteriores parece ser devida a mudanças cariotípicas interpopulacionais talvez provocadas por processos evolutivos como deleções e ampliações de DNA satélite da RON.

Em *E. lanceolatus* a ocorrência de bandas DAPI<sup>+</sup> teloméricas em 14 cromossomos acrocêntricos, além das bandas CMA<sup>+</sup> na região do satélite diferenciou essa espécie das demais estudadas neste trabalho e daquelas analisadas por Forni-Martins. Essas bandas só foram evidenciadas após o bandeamento C/CMA/DAPI e também foram C positivas (Feitoza, L. dados não publicados). Todavia, o registro por Costa et al., (2006) de oito bandas teloméricas também C e DAPI positivas em *E. macrophyllus* poderia indicar uma relação citotaxonômica mais estreita entre essas duas espécies. Contudo, *E. macrophyllus* é considerada uma espécie polifilética *sensu* (Haynes e Holm-Nielsen, 1986) e suas subespécies foram localizadas em diferentes ramos do cladograma de Lehtonen (2006). *E. macrophyllus*, além das bandas DAPI terminais, apresentou bandas intersticiais nos braços longos de três pares acrocêntricos. Apesar dessas bandas intersticiais inexistirem em *E. lanceolatus*, em termos estritamente citotaxonômicos elas parecem ser relacionadas, uma vez que o padrão de bandas terminais foi mantido nas duas linhagens. Uma outra hipótese seria que esse padrão de distribuição de bandas teria evoluído paralelamente nas duas linhagens. Essa hipótese é suportada pelo fato de que, na análise de Lehtonen (2006), *E. lanceolatus* é localizado no clado A do subgênero *Echinodorus*, enquanto os diversos ramos de *E. macrophyllus* foram distribuídos no clado B. As bandas C/DAPI<sup>+</sup> de *E. lanceolatus* que foram visualizadas apenas após o tratamento para banda C, sugerem uma composição de pares de base distinta em relação às bandas CMA<sup>+</sup> da RON heterocromática. Segundo Morawetz (1986) e Galasso *et al.* (1995), nem todas as heterocromatinas ricas em GC e AT reagem de mesma forma aos fluorocromos e alguns blocos de heterocromatina podem se mostrar positivos com o bandeamento C enquanto os mesmos blocos podem se comportar de forma neutra no uso de certos fluorocromos, como por exemplo, CMA e DAPI. Um caso semelhante ocorreu com *Nothoscordum fragrans*. Sato (1980) encontrou diferentes classes de segmentos heterocromáticos nos cromossomos dessa espécie, sugerindo que esta fração

pode ser heterogênea em sua composição de bases de DNA e que só é revelada após determinados tratamentos, como o bandeamento C, por exemplo.

O cariótipo fortemente bimodal das espécies de *Echinodorus* também ocorre no gênero *Sagittaria*, que tem igualmente  $2n=22$  e fórmula cariotípica  $2m+20a$ . Todavia, não existem informações sobre o comportamento da heterocromatina nesse gênero. Na análise filogenética de *Echinodorus* e gêneros afins (Lehtonen, 2006), o gênero *Echinodorus* foi considerado polifilético pelo fato das espécies do subgênero *Helianthium* serem mais relacionadas a *Sagittaria* do que com o subgênero *Echinodorus*. A única espécie analisada do subgênero *Helianthium*, *E. tenellus*, não mostrou qualquer diferença no padrão de bandas e localização dos sítios de DNAr 45S que diferenciasses essa espécie das demais espécies do gênero. Com exceção de *E. lanceolatus* apenas com bandas DAPI terminais, *E. macrophyllus*, com bandas DAPI intersticiais e terminais e *E. longipetalus* apenas com bandas DAPI intersticiais (Costa *et al.*, 2006), as demais espécies foram estáveis em termos de localização e quantidade da heterocromatina e também dos sítios de DNAr 45S. Considerando o cladograma da Figura 1 do artigo de Lehtonen, as variações no padrão de bandas CMA/DAPI que ocorreram nos cladogramas A e B, não foram observadas na única espécie estudada do subgênero *Helianthium*. Em três populações de *Sagittaria rhombifolia* Cham. (Costa *et al.*, 2007), uma delas apresentou cinco sítios, outra oito e outra nove sítios de 45S DNAr, todos nos braços curtos de cromossomos acrocêntricos. Os autores acreditam que a variabilidade intraespecífica observada nessa espécie, *Sagittaria rhombifolia*, tenha sido ocasionada por eventos de translocação equilocal. Porém, se faz necessária a análise do padrão de bandas e da localização dos sítios de DNAr em outras espécies da seção *Helianthium* e do gênero *Sagittaria*, para se ter uma idéia mais clara da evolução da heterocromatina na família como um todo.

Na família Limnocharitaceae o uso de fluorocromos e FISH foram realizados pela primeira vez nas espécies aqui tratadas. *Limnocharis flava* e *L. laforestii* apesar de apresentarem bandas CMA<sup>+</sup> localizadas no braço curto de dois pares acrocêntricos, divergiram em termos de composição de pares de base. Em *L. flava*, todas as bandas CMA foram neutras com DAPI, enquanto em *L. laforestii* essas bandas foram claramente negativas e neutras com DAPI, indicando que nesta última, as bandas ricas em GC, corresponderam a regiões pobres em AT, o que não ocorreu em *L. flava*. Um padrão semelhante foi observado em *Scilla siberica*, onde grandes blocos CMA<sup>+</sup> foram indistinguíveis com DAPI, enquanto em *Ornithogalum caudatum* as bandas CMA foram

claramente negativas para DAPI (Schweizer, 1976). Essas diferenças foram confirmadas após a hibridização *in situ*, onde *L. flava* apresentou quatro sítios de DNAr 45S, enquanto em *L. laforesti* ocorreram apenas dois. As duas espécies são morfologicamente próximas e têm sido muitas vezes identificadas como uma só em materiais de herbário. Todavia, na natureza, ocorrem simpatricamente e não apresentam formas intermediárias (Haynes e Holm-Nielsen, 1992). Apesar de terem cariótipos com o mesmo número cromossômico e idênticas fórmulas cariotípicas, as diferenças na composição de pares de base e número de sítios 45S sugerem que as espécies são geneticamente distanciadas, o que talvez impossibilite cruzamentos interespecíficos.

As duas espécies de *Hydrocleys* analisadas no presente trabalho também apresentaram padrões de bandas CMA/DAPI claramente distintos. *Hydrocleys martii* apresentou blocos CMA<sup>+</sup> em um par metacêntrico, enquanto *H. nymphoides* as bandas CMA<sup>+</sup> ocorreram nos braços curtos de um dos pares acrocêntricos. Este padrão coincidiu com o observado por Kenton (1981) para três populações do Brasil e da Argentina, mas aparentemente diverge do registro de Forni-Martins e Calligaris (2002), onde o idiograma para esta espécie mostra um par metacêntrico satelitado. Uma outra espécie analisada por Kenton (1981), *H. modesta*, apresentou 2n=14, mas não teve sua heterocromatina localizada, nem foi possível visualizar satélites. Em *Hydrocleys*, um gênero com apenas cinco espécies conhecidas, há registros cariológicos para três espécies, das quais se conhece a localização da heterocromatina para duas delas.

A localização preferencial da RON heterocromática nos braços curtos de um ou dois pares acrocêntricos parece ser um fenômeno recorrente em todos os gêneros analisados de Alismatales. Entretanto, *H. martii* apresentou um padrão divergente, tendo um único par metacêntrico portando duas bandas CMA<sup>+</sup> terminal. Embora não tendo conseguido localizar os sítios 45S para esta espécie, é muito provável que assim como nas demais espécies estudadas, este par metacêntrico seja também portador da RON. *H. nymphoides* e *H. martii* ocuparam diferentes ramos do cladograma proposto por Haynes e Holm-Nielsen (1992) com base em dados morfológicos, o que é corroborado pelos nossos dados. Sendo as bandas CMA<sup>+</sup> localizadas nos braços curtos dos acrocêntricos em todas as espécies analisadas de Alismatales, é aceitável a hipótese de que essa alteração tenha se processado através da translocação da banda heterocromática de um acro para o metacêntrico de *H. martii*.

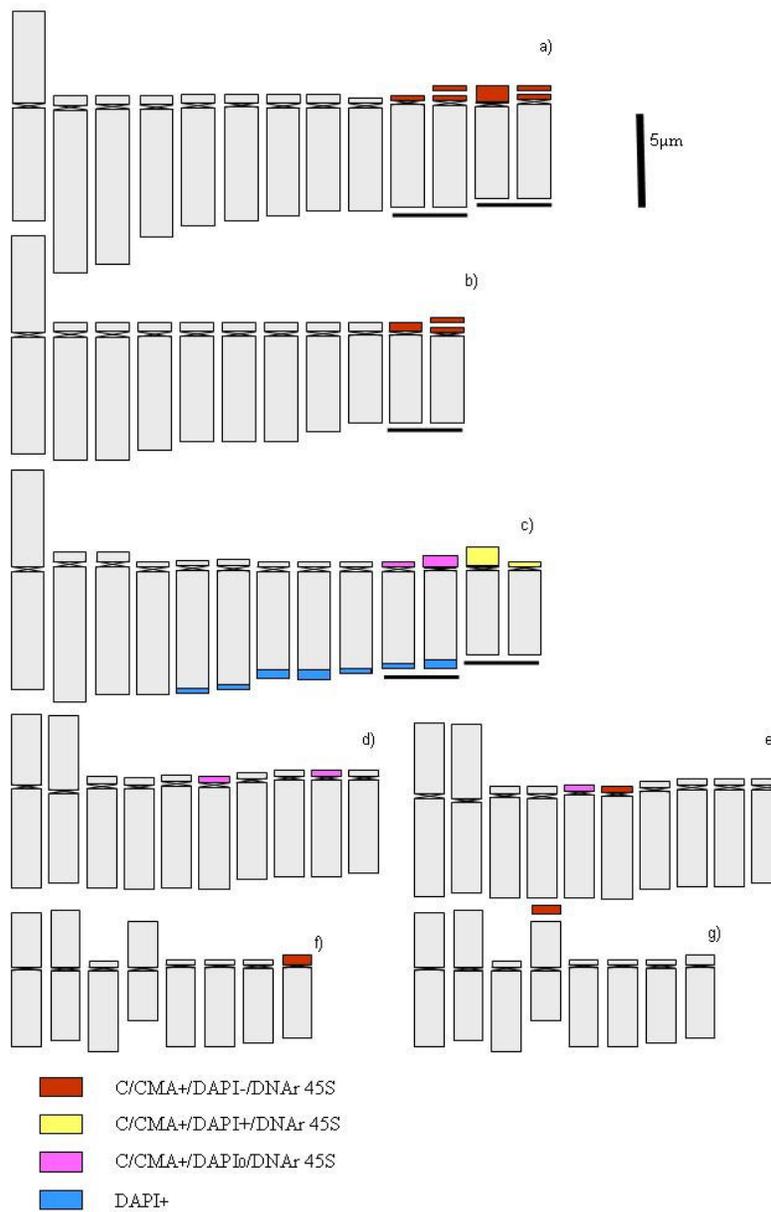
### **Agradecimentos**

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo para o primeiro autor.

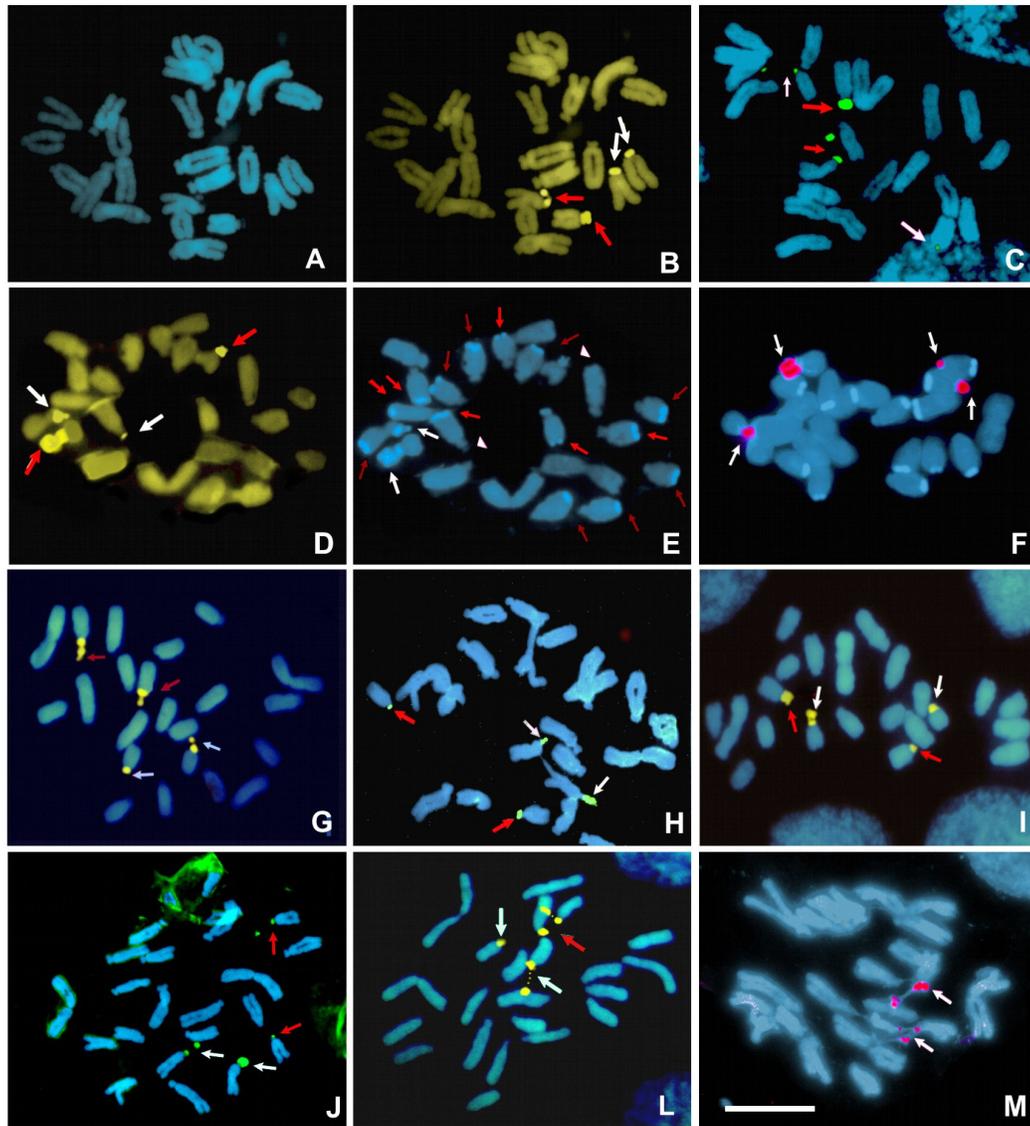
**Tab. 1.** Relação de espécies pertencentes às Famílias Alismataceae e Limnocharitaceae (Alismatales) e dados obtidos.

Famílias/ Espécies/Local de Coleta	2N	FC	Sítios DNAr 45S	CMA/DAPI	C/CMA/DAPI
<b>Alismataceae</b>					
<i>Echinodorus paniculatus</i> Micheli Campo Maior – PI / Areia - PB	22	2m+20a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	4 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
	22	2m+20a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	4 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
<i>E. grandiflorus</i> (Cham & Schlecht) Mich Cachoeira do Urubu – CE / Itapororoca - PB	22	2m+20a	4 sítios	2 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>
				2 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
	22	2m+20a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>	4 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>
<i>E. andrieuxii</i> (Hook & Arnott)					
Haynes & Holm-Nielsen Campo Maior - PI	22	2m+20a	3 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	4 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
<i>E. lanceolatus</i> Rataj Rio Grande do Sul - RS	22	2m+20a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>+</sup> 2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup> 14 C/DAPI <sup>+</sup>
<i>E. tenellus</i> (Mart.) Buchenau Campo Maior - PI	22	2m+20a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>+</sup> 2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
<b>Limnocharitaceae</b>					
<i>Hydrocleys nymphoides</i> (Willd) Buchenau Areia - PB	16	4m+2sm+10a	2 sítios	2 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
<i>Hydrocleys martii</i> Seubert Esperança - PB	16	4m+2sm+10a	2 sítios	2 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>
<i>Limnocharis flava</i> (L.) Buchenau Recife - PE	20	4m+16a	4 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>	4 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>
<i>Limnocharis laforestii</i> Duchass. Areia - PB	20	4m+16a	2 sítios	4 CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup>	2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>-</sup> 2 C/CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>0</sup>

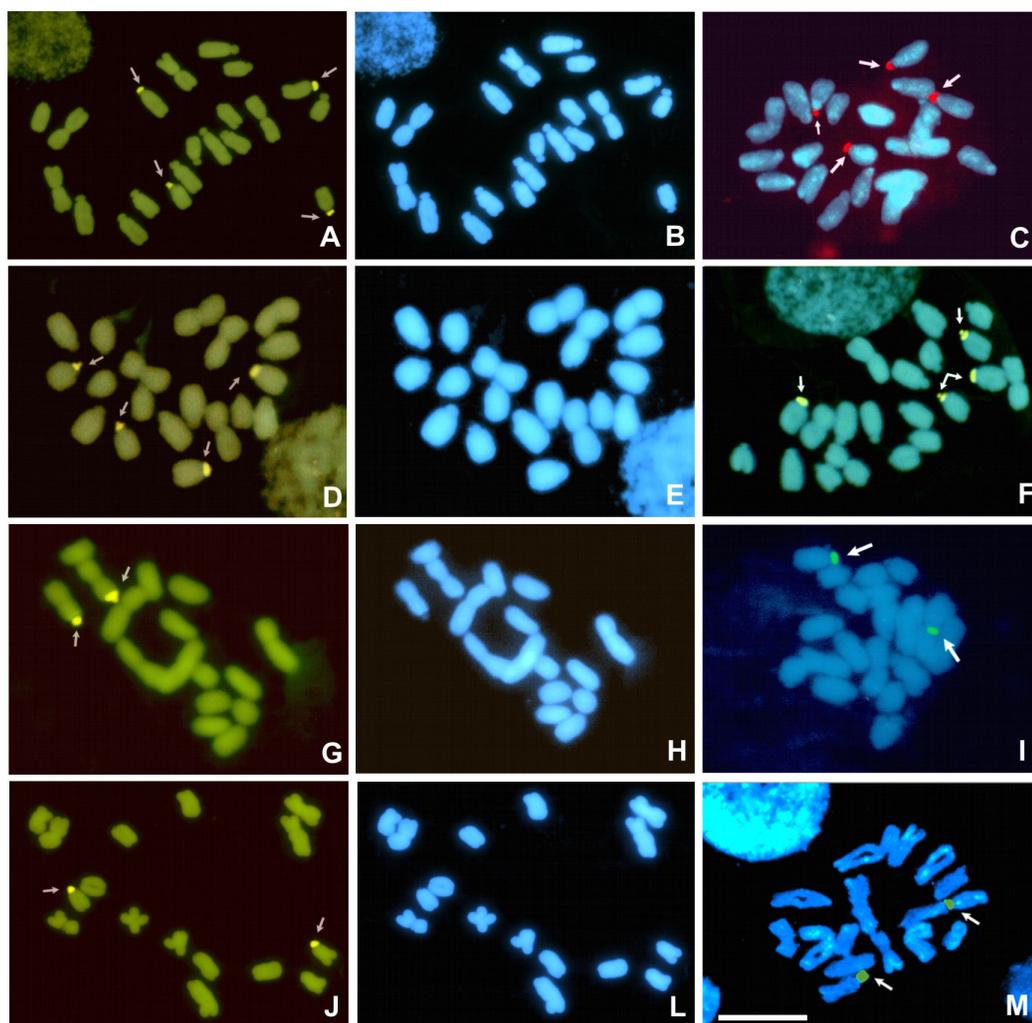
Abrev.: **2N**: Número diplóide; **FC**: Fórmula Cariotípica; **CMA/DAPI**: heterocromatina visualizada por fluorocromos; **C/CMA/DAPI**: heterocromatina detectada com bandeamento C e corada sequencialmente com os fluorocromos **CMA/DAPI**.



**Figura 1** - Idiograma das espécies de Alismatales. **a)** *Echinodorus paniculatus*, **b)** *E. andrieuxii*, **c)** *E. lanceolatus*, **d)** *Limnocharis flava*, **e)** *L. laforestii*, **f)** *Hydrocleys nymphoides* e **g)** *H. martii*; **a, b, c,** n=11 e barra horizontal mostrando o par heteromórfico para distensão da RON; **d e e,** n=10; **f e g,** n=8.



**Figura 2** - Coloração CMA/DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e DNAr 45S em espécies do gênero *Echinodorus* ( $2n=22$ ). *E. paniculatus*, **A**) DAPI, **B**) CMA, **C**) sítios de DNAr 45S; *E. lanceolatus*, **D e E**) C/CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>, **F**) sítios de DNAr 45S e bandas DAPI<sup>+</sup>; *E. tenellus*, **G**) CMA<sup>+</sup>/DAPI, **H**) sítios de DNAr 45S; *E. grandiflorus*, **I**) CMA<sup>+</sup>/DAPI, **J**) sítios de DNAr 45S; *E. andrieuxii*, **L**) C/CMA/DAPI e **M**) sinais de DNAr 45S. Setas da mesma cor nas fotos de CMA indicam pares homólogos; setas vermelhas em **E** indicam 14 blocos terminais DAPI<sup>+</sup>. Sinais em verde representam sonda marcada com digoxigenina/FITC (**C**, **H e J**), sinais em vermelho representam sonda marcada com biotina/TRITC (**F e M**). Barra em **M** equivale a 10µm.



**Figura 3.** Coloração com CMA/DAPI, bandeamento C/CMA/DAPI e FISH em espécies de *Limnocharis* com  $2n=20$  e *Hydrocleys* com  $2n=16$ . *Limnocharis flava*. **A e B)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>; **C)** sítios de DNAr 45S; *L. laforestii*, **D e E)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup>, **F)** C/CMA<sup>+</sup>/DAPI (imagens sobrepostas); *Hydrocleys martii*. **G e H)** CMA<sup>+</sup>/DAPI; **I)** DNAr 45S; *Hydrocleys nymphoides*. **J e L)** CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>0</sup> e **M)** dois sítios de DNAr 45S. Setas indicam bandas CMA<sup>+</sup> e sítios de DNAr 45S. Barra em **M** corresponde a 10µm.

## Referências Bibliográficas

Angiosperm Phylogeny Group (1998) In ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85:531-553.

Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436.

Baldwin JT Jr e Speese BM (1955) Chromosomes of Taxa of the Alismataceae in the Range of Gray's Manual. *American Journal of Botany* 42: 406-411.

Buznego M e Perez-Saad H 2006. Behavioral and antiepileptic effect of acute administration of the extract of the aquatic plant *Echinodorus berteroi* Sprengel). *Epilepsy e Behavior* 9: 40-45.

Chase MW, Soltis De Soltis PS, Rudall PJ, Fay MF, Hahn WH, Sullivan S, Joseph J, Molvray M, Kores PJ, Givnish TJ, Sytsma KJ e Pires JC (2000) Higher-level systematics of the Monocotyledons: An Assessment of current knowledge and a new classification. In: Wilson Kl, Morrison Da, Eds. *Monocots: Systematics and Evolution* Melbourne: Csiro 3–16.

Chen JM, Chen D, Robert W, Wang GF e Guo YH (2004) Evolution of apocarpy in Alismatidae using phylogenetic evidence from chloroplast *rbcl* gene sequence data. *Bot. Bull. Acad. Sin* 45:33-40.

Costa YJ e Forni-Martins ER (2003) Karyology of some Brazilian species of Alismataceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 143: 159-164.

Costa YJ e Forni-Martins ER (2004) A triploid cytotype of *Echinodorus tenellus*. *Aquatic Botany* 79: 325-332.

Costa YJ, Forni-Martins ER e Vanzela ALL (2006) Karyotype characterization of five Brazilian species of *Echinodorus* (Alismatales) with chromosomal banding and 45S DNAr FISH. *Plant Systematics and Evol.* 257:119-127.

Costa YJ, Vanzela ALL e Forni-Martins ER (2007) Variação cromossômica interpopulacional no número de sítios 45S de DNAr de *Sagítária rhombifolia* (Alismataceae). II Simpósio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. Colômbia.

Dahlgren R, Clifford V. (1981) *The Monocotyledons: a comparative study*. Academic Press, New York.

Forni-Martins ER e Calligaris KP (2002) Chromossomal studies on Neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). *Aquatic Botany* 74: 33-41.

Galasso L, Schmidt T, Pignone D e Heslop-Harrison JS (1995) The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18s-5.8s-25s rRNA genes, 5s rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences. *Theor Appl Genet*, 91: 928-935.

Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol* 23: 1029-1041.

Guerra, M. FISH, Conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 184p, 2004.

Harada I (1956) Cytological studies In Helobiae. Part I. Numbers in seven families. *Cytologia* 21: 306-328.

Haynes RR e Holm-Nielsen LB (1986) Notes on *Echinodorus* (Alismataceae). *Brittonia* 38:325-332.

Haynes RR e Holm-Nielsen LB (1992) The Limnocharitaceae. *Flora Neotropica. Monograph* 62. The New York Botanical Garden, New York.

Haynes RR e Holm-Nielsen LB (1994) The Alismataceae. *Flora Neotropica. Monograph* 64. The New York Botanical Garden, New York.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA e Stevens PF (1999) *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. Sunderland, Ma: Sinauer Associates.

Kenton A (1981) A Robertsonian Relationship in the chromosomes of two species of *Hydrocleys*. *Kew Bull* 36: 487-492.

Lehtonen S (2006) Phylogenetics of *Echinodorus* (Alismataceae) based on morphological data. *Botanical Journal of the Linnean Society* 150:291-305.

Morawetz W e Samuel MRA (1988) Karyological Patterns In The Hamamelidae. In: Crane P e Blackmore S. *Evolution, Systematics and Fossil History Of The Hamamelidae*. Oxford: Clarendon Press 40:129-154.

Morawetz W (1986) Remarks on karyological differentiation patterns in tropical woody plants. *Plant Systematics and Evolution* 152:49-100.

Moscone EA, Matzke MA, Matzke AJM (1996) The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. *Chromosoma* 105: 231- 236.

Sato S, Ohta S, e Kuroki Y. (1980) Heteromorphic appearance of acrocentric nucleolus organizer regions in *Nothoscordum fragrans*. *Cytologia* 45: 87-96.

Schwarzarcher T, Ambros P e Schweizer D (1980) Application of Giemsa Banding to Orchid karyotype analysis. *Plant Systematics and Evol* 134: 293-297.

Schweizer D (1976) Reverse fluorescent chromosome-banding with Chromomycin A and DAPI. *Chromosoma* 58 (4): 307-324.

Souza VC e Lorenzi H (2005) *Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II*.

Yamamoto M e Tominaga S (2003) High chromosomal variability of mandarins (*Citrus* spp.) revealed by CMA banding. *Euphytica* 129: 267-274.

#### 4.0 – CONCLUSÕES

1 - Todas as espécies analisadas apresentaram cariótipo assimétrico, bimodal, núcleos interfásicos reticulados ou tendendo ao semi-reticulado, no caso de *Limnobium laevigatum*, e padrão de condensação profásico uniforme. Esses dados sugerem uma maior proximidade taxonômica entre Alismataceae e Limnocharitaceae e um maior distanciamento em relação às Hydrocharitaceae.

2 - A localização preferencial da RON heterocromática nos braços curtos de um ou dois pares acrocêntricos parece ser um fenômeno recorrente em todos os gêneros analisados de Alismatales. Entretanto, *H. martii* apresentou um padrão divergente, tendo um único par metacêntrico portando duas bandas CMA<sup>+</sup> terminal, sugerindo a ocorrência de uma translocação da banda heterocromática de um acro para o metacêntrico desta espécie.

3 - Considerando que  $n=6$  seja o número básico para Alismatales, a hipótese citogenética mais aceita para as variações cromossômicas numéricas é a de uma evolução cariotípica através de fissões ou fusões cêntricas do tipo *Robertsonianiana*. Nesse caso, o gênero *Echinodorus*  $2n=22$  seria mais derivado, *Limnocharis*  $2n=20$  seria intermediário e *Hydrocleys*  $2n=16$  seria mais primitivo.

4- Os dados cromossômicos deste trabalho e da literatura, não permitem inferir para Hydrocharitaceae, diferentemente de Alismataceae e Limnocharitaceae, a provável rota de evolução numérica.

## ANEXOS

## INSTRUÇÕES PARA AUTORES

REVISTA

---

**Plant Systematics  
and Evolution**  
 Printed in Austria
 

---

Editor-in-Chief: Frank H. Hellwig:  
 ISSN: 0378-2697 (print version)  
 1615-6110 (electronic version)  
 Journal no. 606  
 Springer Wien

**Manuscripts Submission**

Manuscripts should be submitted to: <http://www.editorialmanager.com/plsy> The online manuscript submission and review system for the journal offers easy and straightforward log-in and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats: for manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX; for figures - TIFF, GIF, JPEG, EPS, PPT, and Postscript. NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "Contact us" from the tool bar.

**General**

Only papers written in English will be considered. Maximum length is twenty printed pages including tables and figures. Papers submitted should only comprise new and important results. They must be written in concise form and in clear, grammatical language. Papers sent to the authors for revision should be returned within two months; otherwise they will be treated as new submissions. It is essential that manuscripts be submitted in their final form ready for printing, with the approximate desired position of all figures and tables marked in the margins. To facilitate communication between authors, editors and publisher, the telephone and fax numbers and/or e-mail address of the corresponding author should be provided in the accompanying letter. The full names and addresses of the authors must also be included at the end of the manuscript.

**Text**

The title should be brief and characterise the main contents of the paper. An eventual series title has to be given as footnote.

**Abstract.** All papers should be preceded by an abstract (150 words in maximum) denoting the most important taxa, problems and results treated in the paper.

**Key words.** A list of up to 8 key words, including the complete botanical name and common name (if any) of the plant material, must be supplied. Other key words should include the topic investigated and any special techniques used.

A running title (up to 75 characters) should be suggested by the author(s). Headings. Main headings (Introduction, Materials and methods, etc.) should be placed on separate lines. Small print. Footnotes, Materials and methods sections, Acknowledgements, References, Tables, and figure legends should be marked for small print. Scientific names. Italics should be used for names at generic and lower taxonomic rank, but not for names at higher ranks. Units and symbols. Temperatures may be expressed in degrees Celsius, time in seconds (s), minutes (min), hours (h), days (d). Otherwise, the International System of Units (SI) should be used. Standard chemical symbols and abbreviations for chemical names may be used if they are concise and widely accepted, see *Eur J Biochem* (1993) 213: 1-3. Gene symbols must be written in lower case italics. Protein symbols designated on the basis of gene names are written with first or all letters capitalized and in roman type.

Footnotes to the text should be numbered consecutively. Literature citations in the text should be by author(s) and year. Where there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

Example: ... has been investigated by Sorensson (1993) and Sorensson and Brewbaker (1994) ... Yang et al. (1992) have shown. The list of references should include only publications cited in the text. They should be in alphabetical order by name of the first author with all authors and the complete title of each work cited. Citation must obey the same rules as for the main text. The second and subsequent lines are indented.

**Examples**

are:

a) Articles from journals and other serial publications: Knapp S., Persson V., Blackmore S. (1998) Pollen morphology and functional dioecy in *Solanum* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 210: 113-139.

b) Articles from non-serial collective publications (symposia volumes, encyclopedias, etc.) and books: Verma D. P. S., Nadler K. (1984) Legume-Rhizobium symbiosis: host's point of view. In: Verma D. P. S., Hohn T. (eds.) *Genes involved in microbe-plant interactions*. Springer, Wien New York, pp. 57-93 (Plant gene research).

For standardization of formats, authors are requested to adhere to the following: in Literature Cited, use of abbreviations of journals contained in B-P-H (G. H. M. Lawrence, A. F. G. Buchheim, G. S. Daniels and H. Dolezal, eds., 1968, *Botanico-Periodicum-Huntianum*, Hunt Botanical Library, Pittsburgh), including Supplementum; (G. D. R. Bridson and E. R. Smith, eds., 1991, B-P-H/S, Hunt Institute for Botanical Documentation, Pittsburgh); in taxonomic treatments, use of book abbreviations from TL-II (F. A. Stafleu and R. S. Cowan, 1976-1988, *Taxonomic Literature*, ed. 2, vols. 1-7, Bohn, Scheltema & Holkema, Utrecht; plus Supplements); throughout the text, use of taxonomic author abbreviations from *Authors of Plant Names* (R. K. Brummitt and C. E. Powell, eds., 1992, *Royal Botanic Gardens, Kew*).

It is recommended that the work be divided into Introduction (without heading), Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements (without heading) and References. Details must be given about origin and determination of each organism studied. Scientific (Latin) names should conform to the international rules of nomenclature. Authors of species and infraspecific taxa investigated must be given either when first mentioned in text or included all in one of the tables. In principal, voucher

specimens are to be deposited in a large public herbarium quoted using the abbreviation given in the "Index Herbariorum".

Data matrices including sequence alignments must be made available to the public. There must be a sentence included in the Materials and methods section that such information is available from the corresponding author. "DNA or proteome sequences must be deposited in public data bases (GenBank, EMBL, etc.) before the revised version is sent to the editor."

#### **Tables**

Tables should be numbered consecutively with arabic numbers. Footnotes to tables should be indicated by lower case superscript letters, beginning with a in each table.

#### **Illustrations**

The number of illustrations should be kept at the minimum needed to clarify the text. Double documentation of the same points in figures and tables is not acceptable.

All figures should be numbered consecutively. Halftone illustrations should be submitted as sharp, glossy, high quality photographic prints. Line drawings should be supplied as black-and-white drawings suitable for reproduction. Figures that are to appear together should be either photographed as a group or mounted together on flexible white drawing paper (0.4 mm thick, about 300 g/m<sup>2</sup>). All figures should be trimmed at right angles and be of a size permitting direct printing: no more than 7.6 cm across for column width, no more than 15.9 cm for page width, no higher than 22.7 cm. (The publisher reserves the right to reduce illustrations.)

Illustrations can be published in colour only if authors agree to bear some of the extra costs for reproduction and printing.

In line drawings all lines should be of uniform thickness; letters and numbers should be of professional quality and proper dimensions (approx. 2 mm high after reduction). Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings. Photographs should exhibit high contrast. Arrows, letters and numbers should be inserted with template rub-on letters. Illustrations showing organisms or their details should have an internal scale with the dimensions stated in the legend.

Legends should be typed on a separate sheet. Each legend should be explanatory and meaningful without reference to the text.

#### **Open Choice Publication**

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular 'subscription-based' article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will be published as regular subscription model articles. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

[www.springeronline.com/openchoice](http://www.springeronline.com/openchoice)

#### **Proofs, Offprints**

For all papers page proofs will be sent as PDF files to the authors. Misprints only should be corrected, and no changes of contents or style should be made on the page proofs. Costs caused by changes or revisions in the page proofs – other than those resulting from printer's errors – exceeding 10 per cent of the typesetting costs will be charged to the author.

Springer will supply the corresponding author with one PDF-file of each paper free of charge for your own personal use. Additional offprints may be ordered at cost price. A price list and an order form will be sent with the proofs. The filled – in order form should accompany the corrected proofs when they are returned.

#### **Online First Publication**

Online First articles are published in electronic form weeks before distribution of the printed journal. An Online first publication date is published in each Online First article and its print version. Authors should be aware that after electronic publication they cannot withdraw an article or change its content. Any corrections have to be made in an Erratum which will be hyperlinked to the article. Online First articles can be cited using their Digital Object Identifier, a unique and consistent identification code included in both the print and the electronic versions.

#### **Communication**

All business communications and all correspondence concerning technical details, financial items, and offprints should be addressed directly to

SpringerWienNewYork  
Production Department  
Sachsenplatz 4-6  
P.O. Box 89  
1201 Wien  
Austria



INSTRUÇÕES PARA AUTORES  
REVISTA  
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

ISSN 1415-4757 (versão impressa)

São Paulo, Brasil

## SUBMISSION OF PAPERS

### 1. Manuscripts should be submitted to:

*Angela M. Vianna-Morgante*, Editor-in-Chief Genetics and Molecular Biology  
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736 14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

### 2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

**a)** A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. **b)** A copy of the manuscript, including original figures. **c)** A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission. **d)** A copy of the text, tables and figures. Formats for text are **Word** or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or **JPEG** formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

### 3. Categories of Contribution

#### 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

**a) The title page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

**b) The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

**c) The text** must be as succinct as possible. *Text citation s*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al.". List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000; Frota-Pessoa *et al.*, 1994). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). *Number s*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Name s*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for

programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

**Introduction** – Description of the background that led to the study.

**Material (or Subjects) and Methods** – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

**Results** – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

**Discussion** – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

**d) The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) The References Section:** references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles. Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eye-lid-less microteiid lizard radiation: The X 1X 1X 2X 2:X 1X 2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:103-120.

*Sample book citation:*

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

*Sample chapter-in-book citation:*

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From Cytogenetics to Molecular Genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd.ed.Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

*Sample Electronic Article citation:*

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD, Van Dyke T (2004) pRb Inactivation in Mammary Cells Reveals Common Mechanisms for Tumor Initiation and Progression in Divergent Epithelia. *Plos Biol* 2: 194-205. <http://www.plosbiology.org> .

**f) Internet Resources Section**

This section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

**g) Tables** each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

**h) Figures** must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

**i) Nomenclature** should adhere to current international standards.

**j) Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

**k) Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

**l) Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

**3.2 Short Communications** present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section.

**3.3 Letters to the Editor** relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

**3.4 Review Articles** are welcome.

**3.5 Book Reviews:** publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

**3.6 History, Story and Memories** accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

**4. Proofs:** Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

**5. Reprints** are free of charge and provided as a pdf-file.