

MARIA LUIZA DA SILVA

**CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Eichhornia* KUNTH,
PONTEDERIACEAE KUNTH**

RECIFE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Eichhornia* KUNTH,
PONTEDERIACEAE KUNTH**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Depto. de Biologia, Área de Genética/UFRPE

CO-ORIENTADORA:

Dr^a. Lidiane de Lima Feitoza
Depto. de Biologia, Área de Genética/UFPI

RECIFE

2014

Ficha catalográfica

S586c Silva, Maria Luiza da
Citogenética em espécies do gênero *Eichhornia* Kunth,
Pontederiaceae Kunth / Maria Luiza da Silva. – Recife, 2014.
65 f. : il.

Orientador: Reginaldo de Carvalho.
Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia,
Recife, 2014.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Giemsa 2. CMA/DAPI 3. Variação numérica
4. Heterocromatina 5. Sítios de DNAr 45S e 5S 6. *Eichhornia*
I. Carvalho, Reginaldo de, orientador II. Título

CDD 581

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

**CITOGENÉTICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Eichhornia* KUNTH,
PONTEDERIACEAE KUNTH**

MARIA LUIZA DA SILVA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador:

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho
Titular / UFRPE

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Zickel
Titular / UFRPE

Prof^a. Dr^a. Andrea Pedrosa-Harand
Titular / UFPE

Prof. Dr. Luiz Gustavo Rodrigues Souza
Titular / UFPE

Prof^a. Dr^a. Margareth Ferreira de Sales
Suplente / UFRPE

Data de aprovação: 19/02/2014

RECIFE

2014

Dedico este trabalho ao meu padrinho de batismo, José Maurício de Figueiredo Lima, por todo o incentivo na progressão dos estudos e pelo apoio educacional na aquisição de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão será para todos que participaram direta e indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa, em especial:

À **minha pessoa**, pela coragem, persistência, dedicação e apreço pela pesquisa com o gênero *Eichhornia* Kunth.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pelo auxílio financeiro.

Aos **orientadores** pelas críticas e sugestões, enriquecendo, desta forma, o presente estudo.

À coordenadora do PPGB-UFRPE **Carmen Sílvia Zickel** pela autorização da substituição do projeto de pesquisa.

Às professoras **Ana Maria Benko-Iseppon** e **Ana Christina Brasileiro-Vidal** pelo uso do microscópio de fluorescência e consulta aos Índices de Números Cromossômicos.

Ao **Laboratório de Expressão Gênica da UFRPE** pela utilização dos diversos equipamentos, assim como, o compartilhamento de experiências e amizades por toda a equipe de pesquisadores.

Aos membros titulares da banca avaliadora **Andrea Pedrosa-Harand**, **Carmen Sílvia Zickel** e **Luiz Gustavo Rodrigues Souza** pelas sugestões e modificações que foram essenciais para o estudo científico.

Aos amigos de pesquisa científica **Bernarda S. Gregório**, **Genialdo R. Silva**, **Lamonier C. Ramos**, **Leonardo R. C. C. Xavier**, **Lidiane L. Feitoza**, **Lourenço Brandão**, **M^a Angélica O. Marinho**, **Polyanna A. A. Bacelar**, **Reginaldo de Carvalho**, **Rosilda C. Souza**, **Silmar L. Silva**, **Vanessa E. O. Maciel**, **Viviane M. L. Galvão**, pelas múltiplas permutas de conhecimentos e reflexões sobre a ciência e a vida ao longo desses 24 meses e na certeza de que tudo que se inicia tem seu fim e dos momentos vividos deve permanecer aqueles que nos fizeram crescer como pessoa e como profissionais.

Meus sinceros votos de agradecimentos!

“Siga o conselho do seu próprio coração, porque
mais do que este ninguém será fiel a você”.

Eclo 37, 13.

Resumo

Eichhornia é um gênero Neotropical pertencente à família Pontederiaceae. Ocorre em ambientes aquáticos com destacada importância ecológica. Estudos cromossômicos em espécies do gênero são escassos, limitando-se a descrição da quantidade de cromossomos. O presente trabalho teve como finalidade analisar quatro espécies de *Eichhornia* através da coloração convencional com Giemsa, com os fluorocromos CMA e DAPI e pela hibridização *in situ* fluorescente (FISH), visando caracterizar os cariótipos e definir polimorfismos cariotípicos numéricos ou estruturais que contribuam para a diferenciação interespecífica entre essas quatro espécies e para a compreensão da evolução cromossômica do gênero *Eichhornia*. Todas as espécies apresentaram cromossomos pequenos e cariótipos simétricos, medindo desde 0.73 μm em *E. crassipes* a 2.94 μm em *E. heterosperma* e cromossomos predominantemente metacêntricos. As contagens cromossômicas foram $2n = 32$ para *E. crassipes*, $2n = 30$ para *E. heterosperma*, $2n = 28$ para *E. diversifolia* e $2n = 16$ para *E. paniculata*. As espécies investigadas apresentaram núcleos interfásicos variando de arreticulados a semi-reticulados e cromossomos com condensação profásica proximal com coloração mais intensa na região pericentromérica. A coloração CMA/DAPI revelou bandas do tipo CMA⁺/DAPI que foram co-localizadas com os sítios de DNAr 45S nas regiões distais. Dois sinais foram observados para *E. heterosperma* e *E. diversifolia* e quatro sinais em *E. paniculata* e em *E. crassipes*, embora tenham sido observados seis sinais CMA⁺ nesta última espécie. O DNAr 5S não variou em número de sítios, mas em posição. Dois sítios foram observados na região terminal em *E. paniculata* e na região pericentromérica das demais espécies. Eventos de inversão e disploidia cromossômica foram sugeridos para explicar a não colinearidade dos sítios de DNAr 5S.

Palavras-chave: variação numérica, FISH, inversão, disploidia, gênero *Eichhornia*.

Abstract

Eichhornia is a Neotropical genus belonging to the family Pontederiaceae. It occurs in aquatic environments with outstanding ecological importance. Chromosome studies in the genus are scarce, limited to the description chromosome numbers. This study aimed to analyze four species of *Eichhornia*, by conventional Giemsa staining, fluorochrome staining with CMA and DAPI and fluorescent *in situ* hybridization (FISH), to characterize the karyotypes and define numerical or structural karyotypic polymorphisms that could contribute to interspecific differentiation between these four species and the understanding of chromosome evolution of the genus *Eichhornia*. All species have small chromosomes and symmetrical karyotypes, from 0.73 μm in *E. crassipes* to 2.94 μm in *E. heterosperma* and predominantly metacentric. Chromosomal counts were $2n = 32$ for *E. crassipes*, $2n = 30$ for *E. heterosperma*, $2n = 28$ for *E. diversifolia* and $2n = 16$ for *E. paniculata*. The investigated species showed interphase nuclei ranging from areticate to semi-reticulate and proximal early condensation in prophase chromosomes with most intense staining in pericentromeric regions. The CMA/DAPI staining revealed CMA⁺/DAPI bands that were co-localized with 45S rDNA sites in terminal regions. Two signals were observed for *E. heterosperma* and *E. diversifolia*, and four signals in *E. paniculata* and *E. crassipes*, although six CMA⁺ signals were observed in the latter species. The 5S rDNA did not vary in the number of sites but in position. Two sites were observed in the terminal region in *E. paniculata* and in the pericentromeric region in the other species. Chromosomal inversion and dysploidy were suggested to explain the non-collinearity of 5S rDNA sites.

Keywords: numerical variation, FISH, inversion, dysploidy, genus *Eichhornia*.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Citogenética de espécies do gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth)

- Tabela 1** Caracterização morfométrica das espécies de *Eichhornia*. PC (par cromossômico), CTC (comprimento total de cada cromossomo), BL (braço longo), BC (braço curto), R (razão), IC (índice centromérico), TC (tipo de cromossomo), M (metacêntrico). Valores em μm54
- Tabela 2** Lista de espécies do gênero *Eichhornia* com sinônimos, complemento cromossômico total, números cromossômicos (do presente estudo e contagens prévias) e referências.....55

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Citogenética de espécies do gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth)

- Fig. 1** Espécies do gênero *Eichhornia*: *E. crassipes* (a, f), *E. paniculata* (b, c), *E. diversifolia* (d, e) e *E. heterosperma* (g, h).....50
- Fig. 2** Coloração com Giemsa em espécies de *Eichhornia*. *E. crassipes* (a, $2n = 32$), *E. paniculata* (b, $2n = 16$; e, núcleo interfásico semi-reticulado; g, prófase), *E. diversifolia* (c, $2n = 28$; f, núcleo arreticulado) e *E. heterosperma* (d, $2n = 30$). Os insertos mostram cromossomos ampliados. Em (c) o inserto exibe um cromossomo satelitado com RON distendida e seta indica o satélite do cromossomo homólogo. A barra corresponde a 5 μm 51
- Fig. 3** Heterocromatina e sítios de DNAr em cromossomos de *Eichhornia*. *E. paniculata* (a - CMA/DAPI; b - DNAr 5S, c - DNAr 45S), *E. diversifolia* (d - CMA/DAPI, e - DNAr 5S, f - DNAr 45S), *E. heterosperma* (g - CMA/DAPI, h - DNAr 45S, k - DNAr 5S) e *E. crassipes* (i - CMA/DAPI, j - DNAr 5S, l - DNAr 45S). Setas indicam bandas CMA⁺. Cabeças de setas indicam sítios de DNAr 5S. As barras correspondem a 5 μm52
- Fig. 4** Representação esquemática dos cromossomos das espécies de *Eichhornia*. *E. paniculata* (A), *E. diversifolia* (B), *E. heterosperma* (C) e *E. crassipes* (D). Representação da possível fusão (E) em *E. heterosperma* e fissão e inversão em *E. diversifolia* (1B) e *E. crassipes* (7D).....53

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	14
2.1. A família Pontederiaceae Kunth.....	14
2.1.1. Taxonomia e distribuição.....	14
2.1.2. Caracteres morfológicos.....	15
2.2. O gênero Eichhornia Kunth.....	16
2.2.1. Origem, distribuição e ocorrência.....	16
2.2.2. Importância econômica e ecológica.....	17
2.2.3. Características morfológicas.....	18
2.3. Citogenética vegetal.....	19
2.3.1. Relevância para a taxonomia.....	19
2.3.2. Importância das técnicas de citogenética.....	20
2.3.2.1. Coloração convencional.....	20
2.3.2.2. Bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI.....	22
2.3.2.3. Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	23
2.4. Estudos citogenéticos em Pontederiaceae Kunth e Eichhornia Kunth.....	24
3. Referências.....	24

Capítulo I - Citogenética de espécies do gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth)

Resumo.....	34
Palavras-chave.....	35
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados.....	38
Discussão.....	40
Agradecimentos.....	43
Referências.....	44
Apêndices	49
Anexo – Normas da revista.....	56

1. INTRODUÇÃO

A família Pontederiaceae é composta exclusivamente por vegetais palustres e aquáticos (ECKENWALDER; BARRETT, 1986), amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, com poucos representantes em áreas de clima temperado (JUDD *et al.* 2009). Está inserida na ordem Commelinales Mirb. Ex Bercht. & J. Presl juntamente com Commelinaceae Mirb., Haemodoraceae R. Br., Hanguanaceae Airy Shaw e Philydraceae Link (APG III, 2009). Compreende aproximadamente dez gêneros e 30 espécies, ocorrendo no Brasil os gêneros *Eichhornia*, *Heteranthera*, *Hydrothrix* e *Pontederia* com quase 20 espécies (SOUZA; LORENZI, 2012).

O gênero *Eichhornia* Kunth, formado por menos de dez espécies, se destaca por ser nativo dos Neotrópicos (BARRETT, 1988). Entre as seis espécies ocorrentes no Brasil (AMARAL, 2014), *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms originada na América do Sul tropical (JAFARI, 2010; STANLEY; JULIEN; CENTER, 2007) é a de maior relevância, pois além de servir de alimento para roedores, habitat para pequenos invertebrados aquáticos e para a desova de algumas espécies de peixes, também pode ser empregada na purificação de corpos de água poluída e na produção de biogás (TRINDADE *et al.* 2010). Contudo, pode ser considerada uma praga (JUDD *et al.* 2009) devido à propagação excessiva e acelerada em ambientes eutrofizados (CAMPELO *et al.* 2012) em virtude de altas concentrações de fósforo e nitrogênio que estão relacionadas com o crescimento e acúmulo de biomassa (COETZEE *et al.* 2009). As demais espécies do gênero, *E. azurea* (Sw.) Kunth, *E. diversifolia* (Vahl) Urb., *E. heterosperma* Alexander e *E. paniculata* (Spreng.) Solms podem ser úteis como ornamentais (BARRET, 1988) e forrageiras (POTT; POTT, 2000), entre outras utilidades.

Estudos citogenéticos para o gênero *Eichhornia* são escassos, em grande parte restritos à contagem cromossômica, exibindo $n = 8, 15, e 16$ (BARRETT, 1988; ECKENWALDER; BARRETT, 1986). No entanto, há trabalhos que não se limitam apenas à quantidade de cromossomos como o de Pedrosa *et al.* (1999) que também descrevem o tipo de núcleo interfásico, condensação profásica e tamanho dos cromossomos para *E. crassipes* e *E. paniculata*. E mais recentemente, Isa *et al.* (2013) realizaram estudo sobre o comportamento e o arranjo dos cromossomos meióticos em genótipos de *E. crassipes* da Nigéria, propondo uma origem autotetraploide e um novo número básico ($x = 4$) para todo o gênero *Eichhornia*.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo analisar comparativamente os cariótipos de quatro espécies do gênero *Eichhornia* por meio da técnica convencional com Giemsa 2%, CMA/DAPI e FISH com sondas de DNAs ribossomais 5S e 45S visando

caracterizar os cariótipos, detectar polimorfismos cariotípicos que contribuam para a distinção das espécies e compreender a evolução cromossômica do gênero *Eichhornia*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A família *Pontederiaceae*

2.1.1. Taxonomia e distribuição

Segundo a classificação de Takhtajan (1969) e Cronquist (1981; 1988) a família Pontederiaceae Kunth era incluída na subclasse Liliidae Takht e ordem Liliales Lindl. No entanto, nenhuma similaridade cariotípica foi encontrada entre Pontederiaceae e Liliaceae (SEN, 1975).

Com a classificação de Dahlgren, Clifford e Yeo (1985) Pontederiaceae foi introduzida na superordem Bromeliiflorae juntamente com as famílias Haemodoraceae e Philydraceae. Neste sistema, a família era a única na ordem Pontederiales Hook. Com a proposta de um novo sistema de classificação (APG - The Angiosperm Phylogeny Group) baseado no estudo de sequências de DNA que reflete as relações filogenéticas das plantas (APG I, 1998), Pontederiaceae foi incluída na ordem Commelinales, clado Commelinídeas, subclado Monocotiledôneas e permanece nesta posição até o atual sistema de classificação - APG III (2009).

A quantidade de espécies e gêneros na família ainda não está totalmente definida, podendo variar de 30 a cerca de 43 espécies e de sete a aproximadamente dez gêneros (BARRETT; GRAHAM, 1997; COOK, 1998; ECKENWALDER; BARRETT, 1986; GIULIETTI *et al.* 2005; JUDD *et al.* 2009; SIMPSON, 2006; SOUZA; LORENZI, 2012). Para a maioria dos autores a família é composta por nove gêneros: *Eichhornia* Kunth, *Eurystemon* Alexander, *Heteranthera* Ruiz & Pav., *Hydrothrix* Hook. f., *Monochoria* C. Presl, *Pontederia* L., *Reussia* Dennst., *Scholleropsis* H. Perrier e *Zosterella* Small e estes gêneros estão agrupados em três tribos de acordo com o número de lóculos férteis do ovário: Eichhornieae (*Eichhornia* e *Monochoria*), Heteranthereae (*Eurystemon*, *Heteranthera*, *Hydrothrix*, *Scholleropsis* e *Zosterella*) e Pontederieae (*Pontederia* e *Reussia*) (COOK, 1998; SIMPSON; BURTON, 2006).

A analogia morfológica entre os gêneros dificulta a determinação do número preciso de espécies e muitos dos caracteres morfológicos são alterados pelas condições ambientais, o que dificulta a identificação e sinonimização de alguns indivíduos (GASTAL JUNIOR, 1998). A falta de um consenso quanto ao número exato de espécies é uma consequência dos poucos tratamentos taxonômicos para o grupo principalmente dos que são aliados e ou

comparados com outras ferramentas como anatomia, biologia molecular, bioquímica, citogenética, paleontologia, entre outros.

Muitos trabalhos que fazem referência à família Pontederiaceae no Brasil estão limitados a levantamentos florísticos como os que foram realizados recentemente por Moura-Júnior *et al.* (2013) para a região Nordeste, o de Pott *et al.* (2011) para o Pantanal mato-grossense e Pivari *et al.* (2011) em Minas Gerais. Essas pesquisas foram efetuadas no intuito de verificar a riqueza, distribuição e ou formas biológicas das espécies em ambientes aquáticos sem nenhum estudo taxonômico para a família.

Pontederiaceae possui uma distribuição principalmente pantropical (JOLY, 2002; SOUZA; LORENZI, 2012) com poucas espécies nas regiões temperadas, sendo os gêneros *Eichhornia* e *Heteranthera* predominantemente neotropical com exceção de *E. natans* (Beauv.) Solms-Laub. e *H. callifolia* Kunth que são encontradas na África; enquanto *Eurystemon*, *Hydrothrix*, *Pontederia*, *Reussia* e *Zosterella* são exclusivamente do novo mundo e *Monochoria* e *Scholleropsis* estão restritas ao velho mundo (COOK, 1998; ECKENWALDER; BARRETT, 1986). Possui centro de diversidade na América do Sul (KOHN *et al.* 1996) onde 21 das 34 espécies consideradas por Eckenwalder e Barrett (1986) são encontradas.

No Brasil, a família está constituída por 19 espécies e 4 gêneros [*Eichhornia* (6), *Heteranthera* (7), *Hydrothrix* (1) e *Pontederia* (5)] com ampla distribuição geográfica por ser encontrada em todas as regiões e domínios fitogeográficos do país - Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal - (AMARAL, 2014) comumente presente em ambientes alagados (SOUZA; LORENZI, 2012).

2.1.2 Caracteres morfológicos gerais

Pontederiaceae consiste de ervas paludosas ou aquáticas, submersas, emergentes ou flutuantes, sendo perenes ou raramente anuais. Os caules são rizomatosos ou estoloníferos. As folhas são dísticas ou espiraladas com bainha larga que envolve o caule na base, simples, inteiras, linear a orbicular ou sagitada, com venação paralela a palmada; estípulas axilares, medianas ou ausentes, quando grandes envolvem o caule formando uma ócrea e quando pequenos são reduzidos a uma bainha ou lígula; pecíolos de tamanhos variados, algumas vezes inflados. A inflorescência é um racemo terminal ou axilar, espiciforme, protegida na base por uma bainha, às vezes reduzida a uma flor associada a duas brácteas; pedúnculo glabro ou glandular pubescente. Flores vistosas, bissexuais, zigomorfas ou actinomorfas,

hipóginas, glabras ou com tricomas. O perianto é homoclamídeo ou heteroclamídeo composto de seis tépalas, três internas e três externas, às vezes esses elementos são reduzidos a quatro ou três, as tépalas são quase livres na base ou basalmente conadas, brancas, azuis, amarelas e lilás sarapintadas de amarelo. Os estames são em números de seis, quatro, três (mais três estaminódios) ou um (mais dois estaminódios), com diferentes comprimentos em alguns taxa (associado com heterostilia), diplostêmones ou antipétalos, epipétalos; filetes adnatos ao tubo do perianto; anteras deiscentes por fendas ou poros; grãos de pólen com um, dois ou três sulcos. O gineceu é sincárpico tricarpelar com ovário súpero e um a três lóculos; os estiletos são heteromórficos ou enantiofílicos em alguns taxa; estigma solitário frequentemente com três lóbulos; placentação axial, apical ou parietal; óvulos solitários ou numerosos. Os nectários estão ausentes ou presentes nos septos do ovário. O fruto é uma cápsula loculicida ou noz. As sementes são numerosas ou solitárias, ovoides, usualmente com marcas longitudinais e abundância de endosperma (COOK, 1998; JOLY, 2002; JUDD *et al.* 2009; SIMPSON, 2006; SOUZA; LORENZI, 2012).

2.2. O gênero *Eichhornia* Kunth

2.2.1. Origem, distribuição e ocorrência

Eichhornia é originada nos trópicos do Novo Mundo e é constituída por sete espécies: *E. azurea* (Sw.) Kunth, *E. crassipes* (Mart.) Solms (fig. 1, a-f), *E. diversifolia* (Vahl) Urb. (fig. 1, d-e), *E. heterosperma* Alexander (fig. 1, g-h), *E. paniculata* (Spreng.) Solms (= *E. meyeri* A. G. Schulz) (fig. 1, b-c), *E. natans* e *E. paradoxa* Mart. (BARRETT, 1988; ECKENWALDER; BARRETT, 1986). Dentre essas espécies apenas *E. paniculata* e *E. paradoxa* não se estendem por áreas mais extensas, na qual *E. paniculata* é considerada abundante apenas em alguns locais no Nordeste do Brasil, assim como em Cuba, Jamaica, Nicarágua e Equador; enquanto *E. paradoxa* é encontrada apenas no Brasil, Guatemala e Venezuela (BARRETT, 1988). Diferentemente, as espécies *E. azurea*, *E. crassipes*, *E. diversifolia* e *E. heterosperma*, possuem distribuição bem ampla sendo encontrada na América Central e do Sul e na Índia Ocidental (ECKENWALDER; BARRETT, 1986). E essa amplitude pode estar relacionada tanto com a dispersão das sementes pelas aves aquáticas, as quais são capazes de percorrer longas distâncias (BARRETT; GRAHAM, 1997), como pela propagação vegetativa (BARRETT, 1988).

O gênero *Eichhornia* ocupa diversos ambientes aquáticos naturais como rios, lagos, reservatórios, pântanos e piscinas sazonais, assim como também são capazes de colonizar lugares modificados pelo homem como lavouras de arroz, canais de irrigação e valas de drenagem (BARRETT, 1988).

A espécie *E. crassipes* é frequentemente encontrada em superfícies de rios, canais, reservatórios e lagos (BIANCHINI Jr, 2003) com habitat semelhante ao de *E. azurea*, que é avistada em rios, lagos e pântanos (BARRETT, 1988). *E. heterosperma*, por sua vez, pode ser considerada uma espécie bem resistente, pois suporta a dissecação de ambientes áridos como a caatinga do Nordeste, podendo ser encontrada também em lagos temporários (BARRETT, 1988; TABOSA; MATIAS; MARTINS, 2012). Já *E. paniculata* ocupa áreas de pastagens de baixa altitude, piscinas sazonais e cultura de arroz, enquanto sobre *E. paradoxa* pouco se conhece devido a sua raridade, mas as poucas observações sugerem que esta espécie seja de locais sazonalmente inundados, similar à *E. diversifolia*, que é comumente encontrada em lagos temporários (BARRETT, 1988).

2.2.2. Importância econômica e ecológica

As espécies de Pontederiaceae possuem grande importância ecológica para a dinâmica dos ecossistemas aquáticos (POTT; POTT, 2000). *Eichhornia crassipes* é a espécie mais relevante do gênero. Devido a sua rápida proliferação podem dificultar ou impedir a navegação fluvial (BORTOLOTTTO; NETO, 2005; JOLY, 2002;) e a cobertura da superfície da água impossibilita a entrada da radiação solar, afetando desta forma os organismos aquáticos (NDIMELE; KUMOLU-JOHNSON; ANETEKHAI, 2011).

No entanto, a espécie apresenta finalidades benéficas, pois suas raízes servem de abrigo para macroinvertebrados (NEIFF; CARIGNAN, 1997), produção de biogás e adubação do solo (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2002). As fibras do pecíolo podem ser utilizadas para fazer cestas, tapetes (BORTOLOTTTO; NETO, 2005), corda e papel (JAFARI, 2010); e as folhas e partes aéreas em geral servem para a produção de ração ou como forragem para bovinos (GARCIA *et al.* 2000; HENRY-SILVA; CAMARGO, 2002). A planta também é destinada à fabricação de fertilizantes, purificação da água, alimentação (NDIMELE; KUMOLU-JOHNSON; ANETEKHAI, 2011) e desova de peixes (JOLY, 2002). É considerada um indicador biológico (LIMA *et al.* 2011) de poluição hídrica (SPÓSITO, 2013) e serve também na fitorremediação, que é a utilização de plantas como agentes despoluidores

(PROCÓPIO *et al.* 2005) de metais pesados (ODJEGBA; FASIDI, 2007; PEREIRA *et al.* 2011; RUBIO *et al.* 2004).

As espécies relacionadas do gênero como *E. diversifolia* e *E. paniculata* podem ser utilizadas tanto para forragem de animais paludícolas e cavalos, respectivamente, quanto para uso ornamental (POTT; POTT, 2000). Entretanto, *Eichhornia paniculata* também é considerada infestante em lagoas destinadas para piscicultura e lavouras de arroz irrigado, assim como *E. azurea* que forma grandes ilhas podendo impedir a passagem de pequenas embarcações (LORENZI, 2008), mas é de extrema relevância ecológica porque é habitat de caranguejos e peixes (POTT; POTT, 2000). A espécie *E. heterosperma* também pode formar coberturas em seus habitat aquáticos (VILLABONA-GONZÁLEZ; AGUIRRE; ESTRADA, 2011) e é considerada um abrigo para o desenvolvimento do lepidóptero *Xubida infusella* (Walker) (STANLEY; JULIEN; CENTER, 2007).

2.2.3. Características morfológicas

As espécies de *Eichhornia* são ervas flutuantes, emergentes ou submersas, anuais ou perenes. Os caules são flutuantes a eretos, rizomatosos a estoloníferos. As folhas são sésseis basais formando uma roseta ou alternas ao longo do caule; as lâminas são simples, inteiras, reniformes, cordadas, cordado-lanceoladas, oval-acuminadas, obovadas ou orbiculares elípticas; o pecíolo é ocasionalmente inflado. A inflorescência é racemosa, espiciforme ou paniculada inserida na axila de uma folha com uma bráctea espatácea. As flores são tubulares, heterostiladas, zigomorfas, consistem em dois verticilos alternados de três tépalas cada um, coloração azul, roxo e rosa-pálido; as tépalas são oblongo-lanceoladas, glandular-pubescentes, com margens inteiras ou fimbriadas. O androceu consiste de seis estames: três compridos e três curtos, com filetes arqueados no ápice, pubescentes ou glabro, anteras pequenas, bitecadas. O ovário é trilobular com duas fileiras de óvulos; o pistilo é alongado, colorido, estigma capitado com três lóbulos ou com três ramos curtos. Os frutos são capsulares loculicidas protegidos pelo tubo do perigônio seco da flor. As sementes são numerosas, pequenas, elipsoides, apiculadas, com superfície reticulada e nervuras longitudinais perceptíveis (COOK, 1998; NASCIMENTO *et al.* 2013; NOVARA, 2012).

E. azurea é uma planta aquática flutuante fixa, perene que quando jovem é submersa (LALLANA; MARTA, 1981; POTT; POTT, 2000). Possui longos caules providos de folhas (LORENZI, 2008) orbiculares a obovadas, glabras; pecíolo não inflado. Inflorescência espiciforme, glabra (NASCIMENTO *et al.* 2013; SANCHES; CERVI; POTT, 2000). As

tépalas são pilosas e as internas fimbriadas. Possuem seis estames concrecidos às tépalas. O estilete é piloso, heterostílico e seu estigma é do tipo tripartido e pubescente (NASCIMENTO *et al.* 2013). *E. crassipes* é uma macrófita flutuante livre ou fixa que exhibe morfologias diferentes, dependendo das condições em que ela cresce e da disponibilidade de nutrientes na água (COETZEE *et al.* 2009). Apresenta folhas reniformes, ápice arredondado, base cuneada; pecíolo inflado (NASCIMENTO *et al.* 2013). Inflorescência espiciforme (SANCHES; CERVI; POTT, 2000) com presença de heterostilia (LALLANA; MARTA, 1980). Contém seis estames, filetes pilosos e anteras oblongas. Estilete piloso, tripartido (NASCIMENTO *et al.* 2013).

E. diversifolia é uma erva flutuante fixa (POTT; POTT, 2000) com folhas submersas, lineares, ápice agudo, base atenuada, margem inteira; folhas emergentes cordiformes, ápice obtuso, base cordada, margem inteira; brácteas espatuladas. Possui seis estames, anteras oblongas. O estilete é piloso, heterostílico e com estigma tripartido (NASCIMENTO *et al.* 2013). *E. heterosperma* é uma planta aquática flutuante (BARRETT, 1988) fixa. Já *E. paniculata* é uma planta emergente, anual (POTT; POTT, 2000), estolonífera, glabra, ereta (LORENZI, 2008); folhas emergentes; inflorescências em panícula e fruto capsular (SANCHES; CERVI; POTT, 2000, 2003).

2.3. Citogenética vegetal

2.3.1. Relevância para a taxonomia

A citogenética é a área que estuda o cromossomo e sua organização (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011) tanto no que diz respeito à sua estrutura, replicação e finalidade quanto à modificação e evolução (GUERRA, 1988) e pode ser subdividida em clássica e molecular.

Estudos citogenéticos clássicos contribuem para o conhecimento da diversidade cromossômica das espécies, visto que fornecem um panorama do comportamento mitótico e meiótico dos mesmos através da detecção de alterações cariotípicas como mudanças no número, morfologia (CHESTER *et al.* 2010) e tamanho dos cromossomos.

A citogenética molecular diz respeito à aplicação de diferentes técnicas da biologia molecular diretamente em preparações citológicas como os tecidos, células, cromossomos e fibras de DNA (HERRERA, 2007). Estudos genômicos juntamente com a citogenética molecular têm fornecido novas perspectivas sobre a natureza dos rearranjos cromossômicos,

mostrando como os genomas evoluem e a causa dessa diversidade (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011).

Dentro dos parâmetros citogenéticos utilizados para caracterizar uma espécie tem-se o número cromossômico, a morfometria, o padrão de bandeamento (GUERRA, 1988), o comportamento meiótico (STACE, 2000) e a localização de sequências de DNA específicas (GUERRA, 2004). Entre esses, o mais utilizado é o número cromossômico, uma vez que a contagem cromossômica produz dados confiáveis e altamente reprodutíveis, além de auxiliar em estudos citotaxonômicos de diversos grupos de plantas ou famílias (GUERRA, 2008).

No entanto, para um estudo mais detalhado do cariótipo, já que o número cromossômico encontra-se conservado em muitas espécies, faz-se necessário a integração de outros dados como estrutura dos núcleos interfásicos, nível de condensação da prometáfase, tamanho e morfologia cromossômica e os padrões de bandas (GITAÍ; HORRES; BENKO-ISEPPON, 2005). Todas essas informações são atribuídas às análises cariotípicas e são extremamente úteis na diferenciação de táxons, principalmente nos casos em que as características fenotípicas são análogas e difíceis de distinguir (ORTOLANI; MATAQUEIRO; MORO, 2007), podendo inferir ou confirmar uma identificação taxonômica (BOWDEN, 1945).

2.3.2. Importância das técnicas de citogenética

2.3.2.1. Coloração convencional

O estudo citogenético é mais comumente realizado em cromossomos mitóticos metafásicos, uma vez que a cromatina encontra-se altamente condensada e os cromossomos nessa fase conservam suas características morfológicas (HERRERA, 2007). O conhecimento sobre esses aspectos físicos do cromossomo se dá através da técnica convencional, no qual é possível identificar o número, a forma, o comprimento individual e relativo dos cromossomos e as posições das constrições primárias e secundárias (STACE, 2000; SINGH, 2002).

O número cromossômico ainda é o caráter citológico mais frequentemente relatado devido a fácil observação e obtenção (WEISS-SCHNEEWEISS; SCHNEEWEISS, 2013), uma vez que se trata de uma técnica relativamente acessível devido ao baixo custo. A união dos caracteres morfológicos com o número cromossômico mostrou-se bastante útil na classificação de diversas famílias (RAVEN, 1975). Muitas vezes, mudanças na quantidade de cromossomos podem ser variáveis dentro de uma espécie, como ocorreu em indivíduos de

uma população de *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae J. St.-Hil.), que apresentou números cromossômicos diversificados como $2n = 12, 13$ e 18 (FELIX *et al.* 2008). No entanto, a variação pode estar relacionada ou não com a diferenciação fenotípica, que no caso dessa espécie tem morfologia usualmente uniforme.

O tamanho dos cromossomos é muito distinto entre as espécies, no entanto determinados grupos tendem a ter cromossomos maiores ou menores (GUERRA, 1988). Gêneros da família Poaceae Barnhart, por exemplo, com cromossomos médios ou pequenos são principalmente de clima tropical ou subtropical, enquanto que aqueles que apresentam cromossomos grandes são encontrados especialmente em climas temperados (ASDULOV, 1931 *apud* STEBBINS, 1966), indicando que muitos estudos citogenéticos precisam ser desenvolvidos a fim de compreender o significado adaptativo e taxonômico das plantas tropicais (GUERRA, 1990).

A disposição da constrição primária é variável, podendo estar localizada entre a região mediana e terminal do cromossomo, no qual podem formar quatro tipos cromossômicos: metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico (GUERRA, 1988). Através da posição do centrômero pode-se determinar a simetria do cariótipo, se simétrico ou assimétrico. De acordo com os tipos de cromossomos, três espécies – *Limnocharis flava* (L.) Buchenau, *L. laforestii* Griseb, *Hydrocleys nymphoides* (Willd.) Buchenau - da família Limnocharitaceae Takht. ex Cronquist foram classificadas com cariótipos assimétricos, que é considerado um caráter derivado e que paralelamente foi acompanhado por mudanças fenotípicas pelo aumento da quantidade de elementos reprodutivos (carpelos e estames) (FORNI-MARTINS; CALLIGARIS, 2002).

A constrição secundária CS - (ou região organizadora do nucléolo – RON) é uma região parcialmente descondensada (GUERRA, 1988) localizada na posição intersticial ou subterminal do cromossomo (WEISS-SCHNEEWEISS; SCHNEEWEISS, 2013). Essas regiões são sítios de origem do nucléolo, no qual é produzido o RNA ribossomal (STACE, 2000) e esses genes ribossomais estão organizados em *tandem*, isto é, sequências de pares de bases que estão repetidas centenas ou milhares de vezes lado a lado (TUCKER; VITINS; PIKAARD, 2010). Essa repetição é necessária porque todas as proteínas indispensáveis à célula são sintetizadas nos ribossomos (SUMNER, 2003).

Nas espécies do gênero *Citrus* L. (Rutaceae Juss.), por exemplo, a CS é um dos aspectos mais importantes, pois em algumas variedades, por meio da coloração convencional, só é possível observar a CS em um dos homólogos (GUERRA *et al.* 1997) mostrando se tratar

de híbridos, uma vez que esses indivíduos retêm apenas um conjunto de genes de RNAr do parental, enquanto o outro é silenciado (MARQUES *et al.* 2011).

2.3.2.2. Bandeamento com os fluorocromos CMA e DAPI

A coloração de base-específica com fluorocromos é empregada na identificação da heterocromatina constitutiva – HC - (BARROS E SILVA; GUERRA, 2010), que é composta de sequências de DNA altamente repetitivo geralmente não codificantes (SUMNER, 2003). A HC pode ser observada na região pericentromérica, muito frequente em cromossomos pequenos, e nas regiões terminais e intersticiais, facilmente visualizadas em cromossomos médios e grandes (GUERRA, 2000). Os blocos de HC podem variar entre espécies próximas e mais raramente entre cromossomos homólogos no mesmo indivíduo, constituindo um importante marcador cromossômico para estudos citogenéticos evolutivos (SUMNER, 2003).

Os corantes fluorescentes como o CMA₃ (liga-se preferencialmente a regiões com maior quantidade de AT - adenina, timina) e o DAPI (adere-se a regiões ricas em GC – guanina, citosina) podem revelar pelo menos sete tipos de heterocromatina – CMA⁰/DAPI⁰, CMA⁰/DAPI⁻, CMA⁰/DAPI⁺, CMA⁻/DAPI⁺, CMA⁺/DAPI⁰, CMA⁺/DAPI⁻, CMA⁺/DAPI⁺ - (BARROS E SILVA; GUERRA, 2010; BERJANO *et al.* 2009; VANZELA; GUERRA, 2000) com base na distribuição das bandas, onde o (-) significa ausência da coloração, (+) a presença dessa coloração e (0) uma região neutra onde não há uma quantidade elevada nem baixa de marcação.

Em populações silvestres de *Lathyrus nervosus* Lam. (Fabaceae Lindl.) foi observado um padrão altamente variável em número, tamanho e posição de bandas heterocromáticas CMA⁰/DAPI⁺, sugerindo que essa versatilidade seja um dos mecanismos envolvidos na evolução dos cariótipos desses indivíduos (CHALUP *et al.* 2012). Também foi verificado divergências em estudos populacionais de *Chamaecrista nictitans* (L.) Moench (Fabaceae), no qual uma população apresentou seis pares de bandas terminais – CMA⁻/DAPI⁺ (2) e CMA⁺/DAPI⁻ (4) - e a outra apenas três pares com blocos CMA⁺/DAPI⁻ terminais, o que pode estar associado à evolução da heterocromatina, uma vez que as populações são isoladas uma da outra (SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004).

As bandas geradas pelos corantes CMA₃ e DAPI podem ser consideradas marcadores específicos, pois permitem reconhecer os pares cromossômicos como ocorre em *Spondias* L. - Anacardiaceae R. Br. (ALMEIDA; CARVALHO; GUERRA, 2007) e quando associados com

a posição de sítios de DNAr podem ser úteis na distinção de genomas de espécies relacionadas e na caracterização citogenética entre populações (GAIERO *et al.*, 2012).

2.3.2.3. Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Hibridização *in situ* (HIS) é uma técnica que tem como princípio básico identificar a posição de uma sequência conhecida de DNA ou RNA (chamada de sonda) no cromossomo, através do pareamento desses segmentos com uma sequência de nucleotídeos localizados dentro da célula (GUERRA, 2004). Essa hibridização pode ocorrer em qualquer fase da meiose ou mitose inclusive na intérfase, mas é comumente feita em cromossomos paquitênicos e metafásicos mitóticos devido a uma melhor visualização. As sequências hibridizadas podem ocorrer em qualquer parte do cromossomo (regiões teloméricas, subteloméricas, RONS, centroméricas, intersticiais...) dependendo do tipo de sonda utilizada (HESLOP-HARRISON, 2000).

Com a inserção de uma molécula fluorescente a técnica passou a ser conhecida como hibridização *in situ* fluorescente (FISH), no qual após a hibridização a sequência alvo exibe fluorescência e pode ser visualizada e fotografada com um microscópio de fluorescência (DEVI; KO; SEO, 2005). Esse método é largamente utilizado na localização de regiões específicas do genoma ou de genes (GARIMBERTI; TOSI, 2010) como os DNAs ribossomais 5S e 45S que são os mais utilizados por serem facilmente isolados e localizados, além de serem conservados evolutivamente (GUERRA, 2004).

O DNAr 45S é localizado nas RONS, visível pelas técnicas de coloração convencional como constrição secundária associada ao satélite (GUERRA, 2004; HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011; MARCON; BARROS; GUERRA, 2003; MEHES-SMITH; NKONGOLO; KIM, 2011). O DNAr 45S ocorre em um ou mais pares cromossômicos e é formado por blocos com muitas repetições na qual cada repetição contém os genes 18S, 5.8S e 26S/28S (26S para plantas HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011; SUMNER, 2003; 28S para animais PEDERSON; POLITZ, 2000). São separados uns dos outros pelos espaçadores ITS (Internal Transcribed Spacer) 1 e 2, que são mais variáveis, sendo utilizados em estudos filogenéticos comparativos (BALDWIN *et al.* 1995) e precedidos e sucedidos pelos ETS (External Transcribed Spacer) também muito variáveis e estudados nas relações filogenéticas de diferentes grupos vegetais (POCZAI; HYVÖNEN, 2010).

Já os sítios de DNAr 5S em geral não são correlacionados com nenhum outro parâmetro citogenético (MELO; GUERRA, 2003; SUMNER 2003) e aparecem em um único

par cromossômico ou mais raramente em dois ou mais pares (GUERRA, 2004; SUMNER 2003) possuindo uma sequência repetida em tandem com 120 pares de bases separados entre si pelo DNA espaçador NTS (Non-Transcribed Spacer) (GALETTI JUNIOR; MARTINS, 2004). Os produtos dos DNAs ribossomais 5S e 18S, 5.8S, 26S/28S juntamente com as proteínas ribossomais é que formam os ribossomos (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2011).

A união de dados citogenéticos são bem informativos e contribuem para um resultado mais consistente, especialmente quando se trata de estudos comparativos interespecíficos e intraespecíficos. Através das fórmulas cariotípicas, números cromossômicos, tamanho cromossômico, distribuição das bandas CMA⁺, sítios de DNAr 5S e principalmente índices de assimetria cariotípica e a quantidade de DNAr 45S foi possível estabelecer que as espécies *Ipheion dialystemon* Guagl. e *I. hirtellum* (Kunth) Traub (tratadas como *Nothoscordum felipponei* Beauverd e *N. hirtellum* (Kunth) Herter) incluídas no gênero *Ipheion* Raf. sejam excluídas, uma vez que as similaridades cariotípicas juntamente com as morfológicas são mais próximas do gênero *Nothoscordum* Kunth (SOUZA; CROSA; GUERRA, 2010).

Sondas moleculares também podem ser consideradas um marcador cromossômico, pois distingue os cromossomos com tamanho e morfologia semelhantes (MEHES-SMITH; NKONGOLO; KIM, 2011). Os DNAs ribossomais podem evidenciar diferentes graus de diversificação genômica (BERJANO *et al.* 2009) para compreender a evolução cariotípica nos grupos (GUERRA, 2012), visto que durante o processo evolutivo esses marcadores podem ser incorporados ou suprimidos (RODRIGUES; SOUZA; CORRÊA, 2012).

2.4. Estudos citogenéticos em Pontederiaceae Kunth e *Eichhornia* Kunth

Pontederiaceae é uma família pequena com cerca de 30 espécies (NOVARA, 2012). Os estudos citológicos na família ainda estão incompletos, pois a maior parte das espécies está caracterizada citogeneticamente apenas pelo número cromossômico haploide ou diploide, enquanto algumas outras não possuem nem um registro (ECKENWALDER; BARRETT, 1986; TROPICOS, 2014). É característico desse táxon a ocorrência de cromossomos pequenos a muito pequenos que variam de $2n = 14 - 80$ (LEITCH *et al.* 2010). O número básico também varia como $x = 7$ (*Monochoria*), $x = 8$ (*Eichhornia*, *Pontederia*) e $x = 15$ (*Heteranthera*) (RAVEN, 1975).

No gênero *Eichhornia* as contagens cromossômicas estabeleceram $n = 8$ para *E. paniculata* e $n = 16$ em *E. crassipes* (BARRETT, 1988). Essas espécies apresentam núcleos

interfásicos do tipo semi-reticulado, condensação profásica homogênea e cromossomos meta-submetacêntricos, possuindo *E. crassipes* aproximadamente a metade do tamanho cromossômico médio de *E. paniculata* (PEDROSA *et al.* 1999).

A poliploidia e aneuploidia do gênero são derivados do número básico original $x = 8$ (BARRETT, 1988), no entanto estudos meióticos no tetraploide *E. crassipes* ($2n = 4x = 32$) sugerem que o número básico original seja $x = 4$ e que as espécies do gênero sejam autopoliploides baseando-se na quantidade de irregularidades meióticas como o aparecimento de univalentes, bivalentes e multivalentes (ISA *et al.* 2013).

3. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.C.S.; CARVALHO, P.C.L.; GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid umbu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, n. 4, p. 541-547, 2007.

AMARAL, M.C.E. **Pontederiaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=DF64D7DC14A1AC048B0CE6F37832C3D8>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

APG I. An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 85, n. 4, p. 531-553, 1998.

APG III. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.

BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S.; DONOGHUE, M.J. The its region nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v. 82, n. 2, p. 247-277, 1995.

BARRETT, S.C.H. Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, n. 3, p. 741-760, 1988.

BARRETT, S.C.H.; GRAHAM, S.W. Adaptative radiation in the aquatic plant family Pontederiaceae: insights from phylogenetic analysis. In: GIVNISH, T.J.; SYTSMA, K.J. (Eds). **Molecular evolution and adaptative radiation**, p. 225-258. New York: Cambridge University Press, 1997. 638 p. ISBN 9780521573290

BARROS E SILVA, A.M.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2010.

BERJANO, R.; ROA, F.; TALAVERA, S.; GUERRA, M. Cytotaxonomy of diploid and polyploid *Aristolochia* (Aristolochiaceae) species based on the distribution of CMA/DAPI

bands and 5S and 45S rDNA sites. **Plant Systematics and Evolution**, v. 280, n. 3-4, p. 219–227, 2009.

BIANCHINI Jr, I. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: THOMAZ, S.M.; BINI, L.M. (Eds.). **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**, p. 85-126. 1ed. Maringá: EDUEM, v. 1, 2003. 341 p. ISBN 978-85-7628-191-7.

BORTOLOTTO, I.M.; NETO, G.G. O uso do camalote, *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, Pontederiaceae, para confecção de artesanato no distrito de Albuquerque, Corumbá, MS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 331-337, 2005.

BOWDEN, W.M. A list of chromosome numbers in higher plants. II. Menispermaceae to Verbenaceae. **American Journal of Botany**, vol. 32, n. 4, p. 191-201, 1945.

CAMPELO, M.J.A.; FILHO, J.A.S.; COTARELLI, V.M.; SOUZA, E.B.; PIMENTA, W.A.; POTT, V.J. Macrófitas aquáticas nas áreas do projeto de integração do Rio São Francisco. In: FILHO, J.A.S. (Ed.) **Flora das caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação**, p. 194-228. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson, 2012. 552 p. ISBN 978-85-88742-50-5.

CHALUP, L.; GRABIELE, M.; NEFFA, V.S.; SEIJO, G. Structural karyotype variability and polyploidy in natural populations of the South American *Lathyrus nervosus* Lam. (Fabaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, n. 4, p. 761-773, 2012.

CHESTER, M.; LEITCH, A. R.; SOLTIS, P.S.; SOLTIS, D.E. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy / hybridization). **Genes**, v. 1, n. 2, p. 166-192, 2010.

COETZEE, J.A.; HILL, M.P.; JULIEN, M.H.; CENTER, T.D.; CORDO, H.A. *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms-Laub. (Pontederiaceae). In: MUNIAPPAN, R.; REDDY, G.V.P.; RAMAN, A. (Eds.) **Biological control of tropical weeds using arthropods**, p. 183-210. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 495 p. ISBN 978-110-7411-265.

COOK, C.D.K. Pontederiaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). **Flowering plant: Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)**, p. 395-403. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, v. 4, 1998. 511 p.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1981. 1262 p.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. New York: The New York Botanical Garden. 1988. 555 p.

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

DEVI, J.; KO, J.M.; SEO, B.B. FISH and GISH: modern cytogenetic techniques. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 307-315, 2005.

ECKENWALDER, J.E.; BARRETT, S.C.H. Phylogenetic systematics of Pontederiaceae. **Systematic Botany**, v. 11, n. 3, p. 373-391, 1986.

FELIX, W.J.P.; DUTILH, J.H.A.; MELO, N.F.; FERNANDES, A.A.; FELIX, L.P. Intrapopulational chromosome number variation in *Zephyranthes sylvatica* Baker (Amaryllidaceae: Hippeastreae) from Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 371-375, 2008.

FORNI-MARTINS, E.R.; CALLIGARIS, K.P. Chromosomal studies on neotropical Limnocharitaceae (Alismatales). **Aquatic Botany**, v. 74, n. 1, p. 33-41, 2002.

GAIERO, P.; MAZZELLA, C.; VAIO, M.; BARROS E SILVA, A.E.; SANTIÑAQUE, F.F.; LÓPEZ-CARRO, B.; FOLLE, G.A.; GUERRA, M. An unusually high heterochromatin content and large genome size in the palm tree *Trithrinax campestris* (Arecaceae). **Australian Journal of Botany**, v. 60, n. 4, p. 378–382, 2012.

GALETTI JUNIOR, P.M.; MARTINS, C. Contribuição da hibridização *in situ* para o conhecimento dos cromossomos de peixes. In: GUERRA, M. (Ed.). **FISH - Conceitos e aplicações na citogenética**, p. 61-88. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p. ISBN 85-89265-06-4.

GARCIA, M.; KLAI, A.; MARCUSSO, C.; ANDRETTA, I.C.C. Aguapé (*Eichhornia crassipes*): uma alternativa alimentar para bovinos de pequenas propriedades no perímetro da represa Billings – estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 3, n. 3, p. 37-43, 2000.

GARIMBERTI, E.; TOSI, S. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), basic principles and methodology. In: BRIDGER, J.M.; VOLPI, E.V. (Eds.) **Fluorescence *in situ* hybridization (FISH): protocols and applications**. p. 3-20. Series: Methods in molecular biology, v. 659, 2010. 451 p. ISBN 978-1-60761-789-1.

GASTAL JUNIOR, C.V.S. *Pontederia cordata* vs *Pontederia lanceolata*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia (Uruguaiana)**, v. 5, n.49, p. 1-27, 1998.

GITAÍ, J.; HORRES, R.; BENKO-ISEPPON, A.M. Chromosomal features and evolution of Bromeliaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1-4, p. 65-80, 2005.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C. V.D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 52-61, 2005.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. 142 p. ISBN 85-277-0065-4.

GUERRA, M. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 75-86, 1990.

GUERRA, M.; PEDROSA, A.; BARROS E SILVA, A.E.; CORNÉLIO, M.T.M.; SANTOS, K.; FILHO, W.S.S. Chromosome number and secondary constriction variation in 51

accessions of a citrus germplasm bank. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 489-496, 1997.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: GUERRA, M. (Ed.). **FISH - Conceitos e aplicações na citogenética**, p. 1-32. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 184 p. ISBN 85-89265-06-4.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, n. 3-4, p.339-350, 2008.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: The end of childhood. **Plant Biosystems**, v. 146, n. 3, p. 703-710, 2012.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 519-526, 2002.

HERRERA, J.C. La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. **Agronomía Colombiana**, v. 25, n. 1, p. 26-35, 2007.

HESLOP-HARRISON, J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. **The Plant Cell**, v. 12, p. 617-635, 2000.

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

ISA, H.; EGBUCHE, K.C.; MALGWI, M.M.; TUKUR, N.A. Cytological studies in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. **American Journal of Plant Physiology**, p. 1-13, 2013.

JAFARI, N. Ecological and socio-economic utilization of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart Solms). **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 14, n. 2, p. 43-49, 2010.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 777 p. ISBN 85-04-00231-4.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009. 612 p. ISBN 978-85-363-1755-7.

KOHN, J.R.; GRAHAM, S.W.; MORTON, B.; DOYLE, J.J.; BARRETT, S.C.H. Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. **Evolution**, v. 50, n. 4, p. 1454-1469, 1996.

- LALLANA, V.H.; MARTA, M. Biología floral de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. en el río Parana médio. **Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral**, n. 11, p. 73-81, 1980.
- LALLANA, V.H.; MARTA, M. Biología floral de *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). **Revista de la Asociación de Ciencias Naturales del Litoral**, n. 12, p. 128-135, 1981.
- LEITCH, I.J.; BEAULIEU, J.M.; CHASE, M.W.; LEITCH, A.R.; FAY, M.F. Genome size dynamics and evolution in monocots. **Journal of Botany**, p. 1-18, 2010.
- LIMA, L.F.; SILVA, S.S.L.; MOURA-JÚNIOR, E.G.; ZICKEL, C.S. Composição florística e chave de identificação das macrófitas aquáticas ocorrentes em reservatórios do estado de Pernambuco. **Rodriguésia**, v. 62, n. 4, p. 771-783, 2011.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 672 p. ISBN 85-86714-27-6.
- MARCON, A.; BARROS, I.C.L.; GUERRA, M. A karyotype comparison between two closely related species of *Acrostichum*. **American Fern Journal**, v. 93, n. 3, p.116–125, 2003.
- MARQUES, A.; FUCHS, J.; MA, L.; HECKMANN, S.; GUERRA, M.; HOUBEN, A. Characterization of eu- and heterochromatin of *Citrus* with a focus on the condensation behavior of 45S rDNA chromatin. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 1, p. 72-82, 2011.
- MEHES-SMITH, M.; NKONGOLO, K.K.; KIM, N. S. A comparative cytogenetic analysis of five pine species from North America, *Pinus banksiana*, *P. contorta*, *P. monticola*, *P. resinosa*, and *P. strobus*. **Plant Systematics and Evolution**, v. 292, n. 3-4, p.153-164, 2011.
- MELO, N.F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosomes numbers. **Annals of Botany**, v. 92, n. 2, p. 309-316, 2003.
- MOURA-JÚNIOR, E.G.; LIMA, L.F.; SILVA, S.S.L.; PAIVA, R.M.S.; FERREIRA, F.A.; ZICKEL, C.S.; POTT, A. Aquatic macrophytes of Northeastern Brazil: checklist, richness, distribution and life forms. **Check List**, v. 9, n. 2, p. 298-312, 2013.
- NASCIMENTO, H.C.E.; ANDRADE, I.M.; SILVA, M.F.S.; MATIAS, L.Q. Pontederiaceae do litoral piauiense, Brasil. **Rodriguésia**, v. 64, n. 3, p. 625-634, 2013.
- NDIMELE, P.E.; KUMOLU-JOHNSON, C.A.; ANETEKHAI, M.A. The invasive aquatic macrophyte, water hyacinth {*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solm-Laubach: Pontederiaceae}: problems and prospects. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 6, p. 509-520, 2011.
- NEIFF, A.P.; CARIGNAN, R. Macroinvertebrates on *Eichhornia crassipes* roots in two lakes of the Paraná river floodplain. **Hydrobiologia**, v. 345, n. 2-3, p. 185-196, 1997.

NOVARA, L.J. Flora del Valle del Lerma. **Aportes Botánicos del Salta – Ser. Flora**, v. 7, n. 14, p. 1-10, 2012. ISSN 0327-506X

ODJEGBA, V.J.; FASIDI, I.O. Phytoremediation of heavy metals by *Eichhornia crassipes*. **Environmentalist**, v. 27, n.3, p. 349-355, 2007.

ORTOLANI, F.A.; MATAQUEIRO, M.F.; MORO, J.R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera x buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 361-367, 2007.

PEDERSON, T.; POLITZ, J.C. The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. **The Journal of Cell Biology**, v. 148, n. 6, p. 1091-1096, 2000.

PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A.E.B.; FELIX, L.P.; GUERRA, M. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 1, p. 49-60, 1999.

PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M.F.; PASQUAL, M. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 259-267, 2011.

PIVARI, M.O.; OLIVEIRA, V.B.; COSTA, F.M.; FERREIRA, R.M.; SALINO, A. Macrófitas aquáticas do sistema lacustre do Vale do rio Doce, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 4, p. 759-770, 2011.

POCZAI, P.; HYVÖNEN, J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 4, p. 1897-1912, 2010.

POTT, V.J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2000. 404p. ISBN 85-7383-091-3.

POTT, V.J.; POTT, A.; LIMA, L.C.P.; MOREIRA, S.N.; OLIVEIRA, A.K.M. Aquatic macrophyte diversity of the Pantanal wetland and upper basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1. p. 255-263, 2011.

PROCÓPIO, S.O.; SANTOS, J.B.; PIRES, F.R.; SILVA, A.A.; SANTOS, E.A.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuronosodium por mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 719-724, 2005.

RAVEN, P.H. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, n. 3. p. 724-764, 1975.

RODRIGUES, P.S.; SOUZA, M.M.; CORRÊA, R.X. Karyomorphology of *Caesalpinia* species (Caesalpinioideae: Fabaceae) from Caatinga and Mata Atlântica biomes of Brazil. **Journal of Plant Studies**, v. 1, n. 2, p. 82-91, 2012.

RUBIO, L.; SCHNEIDER, I.A.H.; RIBEIRO, T.; COSTA, C.A.; KALLFEZ, C.A. Plantas aquáticas: sorventes naturais. **Ciência Hoje**, v. 35, n. 205, p. 68-71, 2004.

SANCHES, A.L.; CERVI, A.C.; POTT, V.J. Levantamento Taxonômico de Pontederiaceae Kunth do Pantanal, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. **III Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-Econômicos do Pantanal**. Os Desafios do Novo Milênio. Corumbá – MS. Novembro. 2000.

SANCHES, A.L.; CERVI, A.C.; POTT, V.J. *Eichhornia meyeri* A. G. Schultz: uma nova citação para o Pantanal nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. **Collectanea Botanica (Barcelona)**, v. 26, n. 1, p. 125-128, 2003.

SEN, S. Cytotaxonomy of Liliales. **Feddes Repertorium**, vol. 86, n. 5, p. 255-305, 1975.

SIMPSON, M.G. **Plant systematics**. 1st ed. Elsevier-Academic Press, 2006. 603 p.

SIMPSON, M.G.; BURTON, D.H. Systematic floral anatomy of Pontederiaceae. **Aliso**, v. 22, n. 1, p. 499-519, 2006.

SINGH, R.J. **Plant Cytogenetics**. 2nd ed. Urbana: CRC Press, 2002. 488p. ISBN 0-8493-2388-6.

SOUZA, L.G.R.; CROSA, O.; GUERRA, M. Karyological circumscription of *Ipheion* Rafinesque (Gilliesioideae, Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 287, n. 3-4, p. 119-127, 2010.

SOUZA, M.G.C.; BENKO-ISEPPON, A.M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionoideae species of Pará, Amazonas, Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 144, n. 2, p. 181-191, 2004.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012. 768 p. ISBN 978-85-86714-39-9.

SPÓSITO, T.H.N. **Parâmetros físico-químicos do efluente de ETE do distrito urbano de Montalvão / SP manejado com aguapé**. 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2013.

STACE, C.A. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. **Taxon**, v. 49, n. 3, p. 451-477, 2000.

STANLEY, J.N.; JULIEN, M.H.; CENTER, T.D. Performance and impact of the biological control agent *Xubida infusella* (Lepidoptera; Pyralidae) on the target weed *Eichhornia crassipes* (waterhyacinth) and on a non-target plant, *Pontederia cordata* (pickerelweed) in two nutrient regimes. **Biological Control**, v. 40, n. 3, p. 298-305, 2007.

STEBBINS, G.L. Chromosomal variation and evolution. **Science**, v. 152, n. 3728, p.1463-1469, 1966.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: organization and function**. 1st ed. North Berwick: Blackwell publishing, 2003. 287 p. ISBN 0-632-05407-7.

TABOSA, A.B.; MATIAS, L.Q.; MARTINS, F.R. Live fast and die young: the aquatic macrophyte dynamics in a temporary pool in the Brazilian semiarid region. **Aquatic Botany**, vol. 102, p. 71-78, 2012.

TAKHTAJAN, A. **Flowering Plants: Origin and Dispersal**. Washington: Smithsonian Institution Press. 1969.

TRINDADE, C.R.T.; PEREIRA, S.A.; ALBERTONI, E.F.; PALMA-SILVA, C. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do *Campus* Carreiros – FURG, Rio Grande, RS. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 1-22, 2010.

TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Project/PCN>>. Acesso em: 05 fev. 2014.

TUCKER, S.; VITINS, A.; PIKAARD, C.S. Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 351-356, 2010.

VANZELA, A.L.L.; GUERRA, M. Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). **Genetics and Molecular Biology**, vol. 23, n. 2 p. 453-456, 2000.

VILLABONA-GONZÁLEZ, S.L.; AGUIRRE, N.J.; ESTRADA, A.L. Influencia de las macrófitas sobre la estructura poblacional de rotíferos y microscrustráceos em um plano de inundación tropical. **Revista de Biología Tropical**, vol. 59, n. 2, p. 853-870, 2011.

WEISS-SCHNEEWEISS, H.; SCHNEEWEISS, G.M. Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. In: LEITCH, I.J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. (Eds). **Plant genome diversity volume 2: physical structure, behavior and evolution of plant genomes**, p. 209-230. Wien: Springer-Verlag, 2013. 353 p. ISBN 978-3-7091-1160-4

CAPÍTULO I

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA:
PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION

Citogenética de espécies do gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth)

Maria Luiza da Silva¹, Lidiane de Lima Feitoza², Reginaldo de Carvalho³

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Bloco 06 - Bairro Ininga, CEP: 64049-550 Teresina, Piauí, Brasil.

³Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética Vegetal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

e-mail: reginaldo.ufrpe@gmail.com

Resumo

O gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae) apresenta 7 espécies, quatro delas ocorrendo no estado de Pernambuco. São plantas de habitat aquático de água doce. Visando ampliar o conhecimento citogenético desse grupo foram estudadas quatro espécies, *E. crassipes*, *E. diversifolia*, *E. heterosperma* e *E. paniculata*, através da coloração convencional, do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI e da FISH com DNAr. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar quatro espécies de *Eichhornia* por meio da coloração convencional com Giemsa, dos fluorocromos CMA e DAPI e da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), visando identificar polimorfismos cariotípicos numéricos ou estruturais que contribuam como parâmetros citogenéticos para a diferenciação interespecífica, além do entendimento da evolução cariotípica do gênero *Eichhornia*. Descrevemos detalhes do cariótipo incluindo tipo de núcleo interfásico, morfologia, tamanho dos cromossomos, disposição da heterocromatina e sítios de DNAr 45S e 5S. Todas as espécies investigadas mostraram cariótipos simétricos com cromossomos pequenos metacêntricos e núcleos interfásicos do tipo arreticulado e semi-reticulado. Os números cromossômicos variaram de $2n = 16$ a $2n = 32$ em *E. paniculata* e *E. crassipes*, respectivamente, $2n = 30$ em *E. heterosperma* e $2n = 28$ em *E. diversifolia*. Blocos de heterocromatina com forte marcação para o corante cromomicina (CMA⁺) ocorreram em posições terminais co-localizados com os sítios de DNAr 45S, sendo dois sinais nas espécies *E. diversifolia* e *E. heterosperma*, quatro em *E. paniculata* e quatro (CMA⁺) e seis (DNAr 45S) em *E. crassipes*. Dois sítios de DNAr 5S foram localizados em um par cromossômico na região terminal de *E. paniculata* e para as

demais espécies a localização dos dois sítios foi na região pericentromérica. Na espécie *E. heterosperma* o DNAr 5S foi localizado no maior par cromossômico. Inferências citoevolutivas para o gênero *Eichhornia* foram discutidas no presente trabalho, com ênfase para os eventos de inversão e disploidia para explicar a variação nos sítios de DNA ribossomais e a não colinearidade dos sítios de DNAr 5S.

Palavras-chave: disploidia, inversão, FISH-DNAr, CMA⁺.

Introdução

O gênero *Eichhornia* Kunth (Pontederiaceae Kunth) compreende sete espécies (Barrett e Graham 1997) distribuídas predominantemente nos Neotrópicos (Eckenwalder e Barrett 1986). No Brasil há a ocorrência de seis espécies, das quais quatro (*E. crassipes* (Mart.) Solms, *E. diversifolia* (Vahl) Urb., *E. heterosperma* Alexander e *E. paniculata* (Spreng.) Solms) são encontradas no estado de Pernambuco (Amaral 2014).

Algumas espécies (*E. crassipes* (Bortolotto e Neto 2005), *E. azurea* e *E. paniculata* (Lorenzi 2008) e *E. heterosperma* (Villabona-González et al. 2011)) podem ser infestantes, cobrindo a maior parte da superfície da água, causando impactos nos ecossistemas aquáticos (Ndimele et al. 2011). No entanto, são úteis para a dinâmica ecológica de outros organismos (Pott e Pott 2000; Neiff e Carignan 1997; Joly 2002; Stanley et al. 2007).

Eichhornia tem sido bastante investigada quanto ao seu sistema reprodutivo (Barrett 1978; Barrett 1985; Barrett 1988; Cunha e Fisher 2009), pois alguns representantes apresentam heterostilia, polimorfismo floral no qual os estames e estigmas apresentam diferentes comprimentos (Barrett 1988); e em níveis filogenéticos morfológicos e moleculares (ver por exemplo: Eckenwalder e Barrett 1986; Graham et al. 1998; Ness et al. 2011). Entretanto, tem sido pouco explorada citogeneticamente, visto que os dados cariotípicos são escassos e referem-se apenas à determinação do número cromossômico (Fedorov 1969; Goldblatt 1981; 1985; Eckenwalder e Barrett, 1986 Goldblatt e Johnson 1990; 1991; Pedrosa et al. 1999).

Em Pontederiaceae existe grande variação entre os números cromossômicos diploides, $2n = 14 - 80$ (Leitch et al. 2010) e números cromossômicos básicos, $x = 7, 8$ e 15 (Raven 1975) sendo mencionado na literatura variações cromossômicas numéricas como aneuploidia (Eckenwalder e Barrett 1986), disploidia e poliploidia (Leitch et al. 2010). Para muitos taxonomistas a contagem cromossômica é o único parâmetro utilizado por ser de fácil

observação e obtenção (Weiss-Schneeweiss e Schneeweiss 2013) e tem sido importante nos estudos das relações intra e interespecíficas (Candan 2013) e na identificação botânica.

No gênero *Eichhornia* nenhum parâmetro citogenético mitótico, além da contagem do número de cromossomos, foi realizado, com exceção para *E. crassipes* e *E. paniculata* que tiveram seus núcleos interfásicos e morfologia cromossômica descrita por Pedrosa et al. (1999). O motivo da escassez de dados para *Eichhornia* e para família Pontederiaceae como um todo, pode estar ligado ao pequeno tamanho dos cromossomos relatado por Leitch et al. (2010), mas pode também estar relacionado à carência de trabalhos com descrição botânica para o gênero, impedindo a identificação das espécies e ou a distribuição geográfica nos continentes, visto que Eckenwalder e Barrett (1986) diz que o gênero possui uma maior ocorrência no continente americano.

Segundo Barrett (1988) os números cromossômicos haploides descritos para o gênero são: $n = 8, 15, 16$, sendo $x = 8$ considerado o número básico original da família. O mesmo autor refere-se às demais espécies com mais de $n = 8$ como tetraploides. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar comparativamente quatro espécies de *Eichhornia* através do número, tamanho, morfologia dos cromossomos metafásicos mitóticos, distribuição das bandas heterocromáticas coradas com os fluorocromos CMA e DAPI e da localização das marcas de DNAr 5S e 45S nas espécies do gênero *Eichhornia*. Com isso, pretendemos detectar polimorfismos numéricos e estruturais e entender melhor os padrões evolutivos de seus cariótipos e os eventos citogenéticos associados. Será importante esclarecer, por exemplo, como surgiu o cariótipo $2n = 30$, visto que $n = 15$ não é múltiplo do número básico proposto para o gênero *Eichhornia* $x = 8$ e, se esse caso, trata-se de um tetraploide com disploidia descendente.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram coletadas quatro espécies do gênero *Eichhornia* (*E. crassipes*, *E. diversifolia*, *E. heterosperma* e *E. paniculata*) sendo a primeira coletada no Açude de Apipucos, localizado em Recife no estado de Pernambuco e as demais, no campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os espécimes foram mantidos no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal da UFRPE para contínua coleta de raiz e até o período de floração para serem dissecadas e depositadas no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho (PEUFR) da UFRPE.

Preparação cromossômica

Para análise mitótica pontas de raízes foram coletadas e pré-tratadas com o antimitótico 8-hidroxiquinoleína 2 mM por 24 h a 10°C. Posteriormente essas raízes foram fixadas em solução Carnoy (álcool etílico:ácido acético, 3:1) por 24 h em temperatura ambiente (TA) e estocadas em freezer a – 20°C.

Coloração convencional

Para a coloração convencional foi utilizado o protocolo de Guerra e Souza (2002). As raízes hidrolisadas em HCl 5N por 20 min a TA, esmagadas em ácido acético 45% e congeladas em nitrogênio líquido para a remoção das lamínulas. As lâminas foram coradas com Giemsa 2% por 10 a 20 minutos e montadas com Entellan (Merck).

Bandeamento fluorescente – CMA₃/DAPI

As preparações foram feitas de acordo com Schweizer e Ambros (1994) com as modificações de Guerra e Souza (2002). As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada e digeridas em solução enzimática a 37°C, contendo 2% de celulase e 20% de pectinase, até que as raízes ficassem macias. Posteriormente as raízes foram lavadas em água destilada e as lâminas foram confeccionadas como descrito acima para coloração convencional. As melhores lâminas foram mantidas por no mínimo 3 dias em TA antes da coloração. Em seguida foram coradas com CMA₃ (0,2 mg/mL, 1h) e DAPI (2µg/mL, 30 min) e montadas com glicerol/Mellvaine. As lâminas foram mantidas por 3 dias em ambiente escuro a TA e logo depois analisadas.

Hibridização in situ fluorescente - FISH

Para a preparação das raízes utilizou-se o procedimento como descrito para a coloração com CMA₃/DAPI e as lâminas foram confeccionadas como descrito acima. O clone D2 de *Lotus japonicus* com 500-pb (Pedrosa et al. 2002) e o clone R2 de *Arabidopsis thaliana* com 6.5-kb (Wanzenböck et al. 1997), foram utilizados como sondas para localizar os sítios de DNAr 5S e 45S, respectivamente. Para a marcação das sondas, o DNA foi isolado através da técnica de mini-prep utilizando o Kit da Invisorb seguindo as recomendações do fabricante. As sondas foram marcadas com Cy3-dUTP (Amersham), através de Nick Translation com o kit Nick Translation Mix (Roche). A FISH seguiu o protocolo de Pedrosa et al. (2002) com modificações. A mistura de hibridização consistiu de: 50% de formamida,

10% de sulfato de dextran, 2 x SSC e 2-5ng/μl de sonda. O processo de desnaturação ocorreu previamente com a sonda por 5 min a 75°C e com as lâminas por 10 min a 75°C. Após a adição da solução da sonda sobre as lâminas, este conjunto foi desnaturado novamente na mesma condição de tempo e temperatura e hibridizado *overnight* a 37°C. As lâminas foram contra coradas com DAPI (2 μg/mL) em meio Vectashield (Vector).

Análise de imagem e medições cromossômicas

Os núcleos interfásicos, prometáfases e metáfases completas e bem espalhadas obtidas com a coloração convencional com Giemsa foram capturados em microscópio Leica DMLB com câmera Leica DFX 350F através do sistema de fotomicroscopia Leica CW4000. A classificação do núcleo interfásico foi feita conforme Guerra (1985b). A medição dos cromossomos foi feita pela média de 8-10 metáfases utilizando o programa *Micromeasure*® versão 3.3. Os idiogramas foram montados e editados com o auxílio do programa *Microsoft Office PowerPoint 2010* e a nomenclatura adotada para a morfologia cromossômica foi a sugerida por Guerra (1988a).

As imagens do bandejamento CMA₃/DAPI e da FISH foram ajustadas no brilho e contraste com o auxílio dos programas *Paint Shop Pro 5* e *Adobe Photoshop CS3* (Adobe Systems Incorporated).

Resultados

A contagem de cromossomos em metáfase revelou $2n = 16$ para *E. paniculata*, $2n = 28$ para *E. diversifolia*, $2n = 30$ em *E. heterosperma* e $2n = 32$ para *E. crassipes* (Fig. 2). Os cromossomos satelitados (1 par) foram mais facilmente visualizados quando as RONS estavam distendidas, como observado em *E. diversifolia* (Fig. 2c, 3d e 3f) e *E. heterosperma* (Fig. 3h). Em algumas células os satélites poderiam ser facilmente interpretados como cromossomos pequenos pela coloração convencional como observado em *E. diversifolia*.

A análise da estrutura da cromatina nuclear permitiu reconhecer núcleos do tipo arreticulado para as espécies *E. diversifolia* (Fig. 2f) e *E. heterosperma*, cujos cromocentros apresentaram-se pequenos e irregulares com leve coloração da cromatina difusa. Em *E. crassipes* e *E. paniculata* (Fig. 2e) foi observado núcleos do tipo semi-reticulado, com cromatina difusa levemente mais corada e cromocentros irregulares, porém discretos, nas diversas células analisadas. O padrão de condensação profásico (Fig. 2g) foi do tipo proximal

para as quatro espécies, sendo observada uma coloração mais intensa na região pericentromérica precocemente condensada no sentido centrômero-telômero.

A morfologia dos cromossomos foi do tipo metacêntrico (Fig. 4 e Tabela 1). Medições cromossômicas indicaram diferenças graduais de tamanhos entre o maior e o menor cromossomo para as espécies (Tabela 1), além de ser claramente visível a presença de cromossomos muito pequenos na metáfase (Fig. 2). As médias do comprimento dos conjuntos cromossômicos dessas espécies são apresentadas na Tabela 2. No entanto, há cromossomos submetacêntricos (para *E. crassipes*, por exemplo) que não foram computados pelo *Micromeasure* porque trabalhamos com média e possivelmente devido ao alto nível de condensação dos cromossomos, houve alguns em que não foi possível visualizar o centrômero. Embora *E. heterosperma* tenha apresentado o maior complemento cromossômico, os cromossomos não estavam no estado máximo de condensação como nas outras espécies (Tabela 2).

Foram observadas bandas CMA⁺/DAPI localizadas na região terminal de todas as espécies (Fig. 3). A espécie *E. paniculata* exibiu quatro bandas (Fig. 3a); *E. diversifolia* mostrou dois blocos, cada um localizado no satélite (Fig. 3d) e *E. heterosperma* apresentou duas bandas distais (Fig. 3g). A espécie *E. crassipes* apresentou uma maior quantidade de bandas de CMA, num total de seis bandas terminais (Fig. 3i), as quais só foram observadas na metáfase com a sobreposição das imagens por serem muito pequenas.

O número e tamanho das bandas observadas nos cromossomos condensados foram confirmados nos diferentes tipos de núcleos interfásicos, que mantiveram parte da heterocromatina CMA condensada. Uma exceção, entretanto, foi *E. crassipes* em que as bandas foram apresentadas de forma mais difusa nos núcleos interfásicos (Fig. 3i).

Em todas as espécies, sítios de DNAr 45S foram localizados distalmente correspondendo à constrição secundária e às bandas de CMA⁺ em *E. diversifolia* (Fig. 3f), *E. heterosperma* (Fig. 3h). e *E. paniculata* (Fig. 3c). Em *E. crassipes*, essa co-localização aconteceu apenas em 4, dos 6 blocos CMA⁺ (Fig. 3l). Os sítios de DNAr 5S foram localizados em apenas um par cromossômico em todas as espécies investigadas, porém em cromossomos diferentes daqueles que possuem o DNAr 45S. Houve diferenças quanto a localização dos sinais DNAr 5S nos pares de homólogos. Em *E. paniculata* (Fig. 3b), o sinal foi terminal, sendo os dois sinais do mesmo tamanho. Para as demais espécies, os sinais de DNAr 5S foram localizados adjacentes ao centrômero, com heteromorfismo em relação à intensidade do sinal.

Discussão

Variações nos núcleos interfásicos e números cromossômicos

A estrutura dos núcleos interfásicos no gênero *Eichhornia* foi do tipo semi-reticulado e arreticulado. Segundo Guerra (2000a) núcleos arreticulados são usualmente encontrados em cariótipos com cromossomos pequenos que apresentam a heterocromatina ou a eucromatina precocemente condensada, na região proximal ou subterminal dos cromossomos profásicos. Núcleos arreticulados também são comumente observados em vários gêneros, entre eles, *Costus* (Guerra 1988b), *Koelreuteria* (Urdampilleta et al. 2005), *Cuscuta* (García e Martín 2007) e *Pennisetum* (Fajardo et al. 2010), com cromocentros correspondendo em geral, em número e em tamanho aos blocos de heterocromatina CMA (Guerra 1985a; Grif 2000). Embora a estrutura nuclear no nível interespecífico seja geralmente constante (Guerra 1985b) pode ocorrer variação em tecidos da mesma espécie ou entre os núcleos de diferentes espécies do mesmo gênero (Guerra 1987), como observados em *Passiflora* (Guerra 1985b) e *Cardiospermum* (Urdampilleta et al. 2012) e em espécies de *Tripogandra* (Marques et al. 2010). Talvez essa possa ser uma possível explicação para *E. paniculata* e *E. crassipes* apresentarem núcleo semi-reticulado, como confirmado por Pedrosa et al. (1999) e *E. diversifolia* e *E. heterosperma* exibirem núcleos arreticulados, como mostrado no presente estudo.

Os números cromossômicos nas espécies foram relativamente baixos, variando de $2n = 16$ em *E. paniculata* para o dobro, $2n = 32$ em *E. crassipes*. Todas as metáfases completas com cromossomos bem espalhados para *E. crassipes* foram analisadas e nem uma contagem diferente de $2n = 32$ foi observada para a espécie, não confirmando contagens isoladas relatadas por Cook (1998) que observou $2n = 30$ e $2n = 58$. Talvez essa discrepância esteja relacionada a erros de contagem ou de identificação da espécie.

No presente estudo, apenas *E. diversifolia* apresentou um número cromossômico diferente de $n = 15$ encontrado por Eckenwalder e Barrett (1986) e Barrett (1988), exibindo $2n = 28$ com presença de dois satélites (Fig. 1c). No presente trabalho, com coloração Giemsa foi difícil distinguir satélites de cromossomos pequenos, principalmente porque a constrição secundária encontra-se muito distendida, não sendo possível identificar com precisão de qual cromossomo pertence o satélite. Essa informação só foi possível com o uso dos fluorocromos CMA/DAPI. Talvez essa seja a justificativa para a discordância com o número encontrado na literatura. Essa dificuldade na contagem cromossômica também foi relatada para as espécies

Vellozia bahiana e *V. glabra*. No primeiro caso, houve discordância do número cromossômico encontrado com dados da literatura; e para *V. glabra* a contagem cromossômica foi variável ($2n = 14-18$) devido, provavelmente, à presença de grandes satélites, não sendo possível diferenciar com precisão de cromossomos (Melo et al. 1997).

Pequeno tamanho dos cromossomos e estabilidade na morfologia dos mesmos

O presente estudo confirma o relato de Leitch et al. (2010) de cromossomos pequenos a muito pequenos para a família, uma vez que segundo Guerra (2000a) cromossomos pequenos possuem menos de $3\mu\text{m}$ e o presente estudo revela uma variação de $0.73\mu\text{m}$ em *E. crassipes* a $2.94\mu\text{m}$ para *E. heterosperma*. Os cromossomos tiveram tamanhos similares para todos os indivíduos estudados, não ultrapassando $2\mu\text{m}$ a diferença entre o maior e o menor cromossomo de cada espécie. Além disso, os índices centroméricos revelaram cromossomos do tipo metacêntricos para todas as espécies. Mesmo que haja a presença de cromossomos submetacêntricos (como visualizado em algumas metáfases de *E. crassipes*), estes são em número reduzidos, não comprometendo a simetria cariotípica do gênero *Eichhornia*.

Heterocromatina CMA⁺ e sítios de DNA ribossomal

As bandas reveladas pela dupla coloração CMA/DAPI foram equivalentes em todas as espécies, já que estão presentes nas regiões terminais com pouca variação em relação ao tamanho das bandas. Embora as bandas equilocais sejam frequentes na região proximal de algumas espécies com cromossomos pequenos, como os da família Fabaceae, por exemplo (Guerra 2000a), os nossos dados também sugerem a conservação de bandas terminais em *Eichhornia*, uma vez que esses blocos evidenciam a similaridade estrutural e funcional dessas regiões entre as espécies estudadas. A posição terminal da heterocromatina é frequente em alguns grupos vegetais com cromossomos diminutos como em *Manihot* (Carvalho e Guerra 2002), *Citrus* (Rutaceae) (Moraes et al. 2007; Carvalho et al. 2005), Asteraceae (Moraes e Guerra 2010; Fregonezi et al. 2004; Torrell et al. 2003) entre outros.

A baixa quantidade de heterocromatina sugere uma condição plesiomórfica para o gênero. Segundo Guerra et al. (2000) há uma correlação aparente entre a riqueza de heterocromatina e caracteres apomórficos. Embora *Eichhornia* e os demais representantes da família Pontederiaceae apresentem características externas derivadas (por exemplo: presença de inflorescência), a evolução não envolve todos os órgãos ao mesmo tempo e muitas

mudanças no genoma podem não refletir nos caracteres morfológicos ou simplesmente podem ser uma resposta aos fatores bióticos e abióticos do ambiente. Além disso, a heterocromatina é composta principalmente de DNA satélite (Kubis et al. 1998; Guerra 2004) com sequências não codificantes (Hemleben et al. 2007) e também de elementos transponíveis (Bennetzen 2000, Redi et al. 2001; Lippman et al. 2004; Slotkin e Martienssen 2007; Kejnovsky et al. 2012). Esses elementos móveis têm preferência por locais específicos do cromossomo onde eles tenham menos efeito deletério (Kejnovsky et al. 2012), como nas regiões de heterocromatina devido ao fato dessa região genômica apresentar um alto nível de condensação.

Nossas observações mostraram uma baixa variação interespecífica de loci de DNAr 45S, o qual variaram apenas de dois a quatro sítios, enquanto que o DNAr 5S manteve-se constante em número de dois sítios. A pequena quantidade de DNAr nas espécies pode estar relacionada com a natureza altamente repetitiva do mesmo, pois essas sequências repetitivas podem sofrer recombinação homóloga alélica (Roa e Guerra 2012) e não alélica (Pedrosa et al. 2006) tornando-se vulnerável à perda de cópias (Kobayashi et al. 2011).

A detecção dos sítios de DNAr 45S na mesma posição da heterocromatina CMA⁺ confirma que apenas uma fração de cópias de DNAr é transcrita e que a heterocromatina estabiliza as sequências repetitivas, pois um elevado número de cópias geraria instabilidade no genoma (Kobayashi 2011). Além disso, a posição de sítios de DNAr 45S na região terminal pode estar associado com a proteção dos telômeros e com a ocorrência de rearranjos estruturais sem efeitos deletérios (Roa e Guerra 2012).

A região cromossômica que codifica o RNAr 5S é variável entre as angiospermas (Wicke et al. 2011) e no presente estudo os sítios de DNAr 5S se apresentaram aparentemente conservados, pois para cada espécie foram observados apenas dois sinais em cromossomos diferentes dos que apresentaram DNAr 45S. Geralmente os DNAr 5S e 45S são variáveis entre si na localização e número. Em algumas espécies isso evidencia que tenham ocorrido rearranjos estruturais (Hamon et al. 2009) podendo estar relacionado com a especiação (Heslop-Harrison 2000). Em *Eichhornia* a diferença de posição dos loci entre a espécie diploide e os tetraploides sugere a ocorrência de possíveis rearranjos como a fusão e a inversão (Fig. 4). A ocorrência de um par cromossômico grande em *E. heterosperma*, pode ter surgido a partir da fusão de dois cromossomos (Fig. 4E). Por outro lado, a presença dos sítios de DNAr 5S nas regiões pericentroméricas pode ter ocorrido devido a inversão paracêntrica da região terminal para próximo do centrômero (Fig. 4F).

Tomando como referência o número básico da família Pontederiaceae ($x = 8$), Barrett (1988) considera tetraploide todas as espécies de *Eichhornia* com mais de $2n = 16$. No caso de *E. diversifolia* e *E. heterosperma*, ambas com dois sítios de DNAr 45S co-localizados com CMA⁺, podem ser, de fato, consideradas tetraploides e que ao longo do tempo tenha ocorrido disploidia descendente. Já *E. crassipes* foi considerada um autopoliploide devido à irregularidades meióticas pela frequência de multivalentes encontrados (Isa et al. 2013). Essa suposição pode ser confirmada pela variação na quantidade de sítios CMA⁺ e DNAr 45S, que sendo *E. crassipes* um poliploide de um representante diploide (*E. paniculata* ou *E. paradoxa*), deveria apresentar o dobro de bandas, se a origem da poliploidia fosse recente (Roa e Guerra 2012), mas a diminuição dessas sequências segundo Weiss e Maluszynska (2000) pode ser característico de um poliploide antigo, ou seja, provavelmente essa espécie esteja se diploidizando (Leitch e Bennet 1997). A ausência de sítios de DNAr 5S duplicados em *E. crassipes* também é sugestivo como característica de um paleopoliploide (Melo e Guerra 2003).

A combinação de técnicas citogenéticas foi significativa na caracterização das espécies estudadas. Os dados cariotípicos revelados no presente estudo são úteis para entender a diferenciação e conseqüente evolução interespecífica dentro de *Eichhornia*. O idiograma representativo das espécies sugere a ocorrência de eventos de inversão cromossômica com transferência do sítio de DNAr 5S terminal, como observado em *E. paniculata*, para a região pericentromérica ocorrente nas demais espécies consideradas poliplóides, seguido de eventos de disploidia descendente. Por outro lado, a ocorrência das espécies com números que não representam múltiplos de $x = 8$ pode ser explicado por eventos independentes de inversão e de fusão em cromossomos distintos, levando a disploidia descendente ou simplesmente a ocorrência de fusão envolvendo os cromossomos portadores dos sítios de DNAr 5S, possivelmente em número de quatro nessas espécies consideradas poliplóides. As análises citogenéticas devem ser expandidas para outros gêneros de Pontederiaceae, assim como a utilização de diferentes sondas DNA como as sequências de DNA centroméricas, a fim de corroborar tais hipóteses e estabelecer uma análise cariotípica mais detalhada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRPE.

Referências

- Amaral MCE (2014) Pontederiaceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB197>>. Acesso em 05 fev. 2014.
- Barrett SCH (1978) Flora biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Aquat Bot* 5:217-228. doi: 10.1016/0304-3770(78)90064-5
- Barrett SCH (1985) Flora trimorphism and monomorphism in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Biol J Linn Soc* 25:41-60. doi: 10.1111/j.1095-8312.1985.tb00385.x
- Barrett SCH (1988) Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. *Ann Mo Bot Gard* 75:741-760. doi: 10.2307/2399363
- Barrett SCH, Graham SW (1997) Adaptive radiation in the aquatic plant family Pontederiaceae: insights from phylogenetic analysis. In: Givnish TJ, Sytsma K (eds) *Molecular Evolution and Adaptive Radiation*. Cambridge University Press, Madison, pp 225–258
- Bennetzen JL (2000) The many hues of plant heterochromatin. *Geno Biol* 1:107.1-107.4. doi: 10.1186/gb-2000-1-1-reviews107
- Candan F (2013) Some observations on plant karyology and investigation methods. In: Silva-Opps M (ed) *Current Progress in Biological Research*, 1st edn. InTech, pp 217-255. doi:10.5772/56081
- Carvalho R, Soares Filho WSS, Brasileiro-Vidal AC, Guerra M (2005) The relationships among lemons, limes, and citron: a chromosomal comparison. *Cytogenet Genom Res* 109:276-282 doi: 10.1159/000082410
- Carvalho R, Guerra M (2002) Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hered* 136:159-168 doi: 10.1034/j.1601-5223.2002.1360212.x
- Cook CDK (1998) Pontederiaceae. In: Kubitzki K (ed.) *Flowering plant: Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*, 1st edn. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 395-403
- Cunha NL, Fischer E (2009) Breeding system of tristylous *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) in the Southern Pantanal, Brazil. *Plant Syst Evol* 280:53-58. doi: 10.1007/s00606-009-0170-z
- Eckenwalder JE, Barrett SCH (1986) Phylogenetic systematics of Pontederiaceae. *Syst Bot* 11:373-391
- Fajardo CG, Davide, LC, Pereira AV (2010) Characterization of interphase nuclei from triploid hybrids between *Pennisetum purpureum* Schumach and *Pennisetum glaucum* (L.). *Cienc Agrotec* 34:1124-1128. doi: 10.1590/S1413-70542010000500007

Fedorov AA (1969) Chromosome numbers of flowering plants. Academy of Sciences of USSR, Leningrad

Fregonezi JN, Torezan JMD, Vanzela ALL (2004) A karyotype study of three Southern Brazilian Asteraceae species using fluorescence *in situ* hybridization with a 45S rDNA probe and C-CMA₃ banding. *Genet Mol Biol* 27:223-227. doi: 10.1590/S1415-47572004000200016

García MA, Martín MP (2007) Phylogeny of *Cuscuta* subgenus *Cuscuta* (Convolvulaceae) based on rDNA ITS and chloroplast TrnL intron sequences. *Syst Bot* 32:899-916. doi:10.1600/036364407783390872

Goldblatt P (1981) Index to plant chromosome numbers 1975-1978. Mo Bot Gard, St Louis

Goldblatt P (1985) Index to plant chromosome numbers 1982-1983. Mo Bot Gard, St Louis

Goldblatt P, Johnson DE (1990) Index to plant chromosome numbers 1986-1987. Mo Bot Gard, St Louis

Goldblatt P, Johnson DE (1991) Index to plant chromosome numbers 1988-1989. Mo Bot Gard, St Louis

Graham SW, Kohn JR, Morton BR, Eckenwalder JE, Barrett SCH (1998) Phylogenetic congruence and discordance among one morphological and three molecular data sets from Pontederiaceae. *Syst Biol* 47:254-567

Grif VG (2000) Some aspects of plant karyology and karyosystematics. *Int Rev Cytol* 196:131-175. doi: 10.1016/S0074-7696(00)96004-2

Guerra M (1985a) Cytogenetics of Rutaceae. III. Heterochromatin patterns. *Caryol* 38:335-346

Guerra M (1985b) Estrutura e diversificação dos núcleos interfásicos em plantas. In: Percin MLRA, Martins OS, Bandel G (eds) Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Sociedade Brasileira de Genética, pp 137-153

Guerra M (1987) Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. *Cytol* 52:213-222

Guerra M (1988a) Introdução à citogenética geral. Editora Guanabara, Rio de Janeiro

Guerra M (1988b) Characterization of different types of condensed chromatin in *Costus* (Zingiberaceae). *Plant Syst Evol* 158:107-115

Guerra M (2000a) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 23:1029-1041. doi: 10.1590/S1415-47572000000400049

Guerra M (2004) Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: Guerra M. (Ed.). FISH - Conceitos e aplicações na citogenética, 1st edn. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. pp 1-32

Guerra M, Santos KGB, Silva AMB, Ehrendorfer F (2000) Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Arantioidae – a case of parallel chromosomal evolution. *Am J Bot* 87: 735-747

Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto

Hamon P, Siljak-Yakovlev S, Srisuwan S, Robin O, Poncet V, Hamon S, De Kochko A (2009) Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: a revised view of species differentiation 17:291-304. doi: 10.1007/s10577-009-9033-2

Hemleben V, Kovarik A, Torres-Ruiz RA, Volkov RA, Beridze T (2007) Plant highly repeated satellite DNA: molecular evolution, distribution and use for identification of hybrids. *Syst Biodivers* 3:277-289. doi: 10.1017/S147720000700240X

Heslop-Harrison JS (2000) Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell* 12:617-635. doi: 10.1105/tpc.12.5.617

Isa H, Egbuche KC, Malgwi MM, Tukur NA (2013) Cytological studies in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Am J Plant Physiol* 8:1-13. doi: 10.3923/ajpp.2013.50.62

Joly AB (2002) Botânica: introdução à taxonomia vegetal. Companhia Editora Nacional, São Paulo

Kejnovsky E, Hawkins JS, Feschotte C (2012) Plant transposable elements: biology and evolution. In: Wendel JF, Greilhuber J, Dolezel J, Leitch IJ (eds) *Plant genome diversity volume 1: plant genomes, their residents and their evolutionary dynamics*, 1st edn. Springer Vienna, Vienna. pp 17-34

Kobayashi T (2011) Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci* 68:1395–1403. doi: 10.1007/s00018-010-0613-2

Kubis S, Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot* 82:45-55. doi: bo980779

Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF (2010) Genome size dynamics and evolution in monocots. *J Bot* 1-18. doi: 10.1155/2010/862516

Leitch IJ, Bennet MD (1997) Polypoidy in angiosperms. *Tren Plant Sci* 2:470-476. doi: 10.1016/S1360-1385(97)01154-0

Lippman Z, Gendrel AV, Black M et al (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nat* 430:471-476. doi: 10.1038/nature02651

Lorenzi H (2008) Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Plantarum: Nova Odessa

Marques A, Roa F, Guerra M (2010) Karyotype differentiation in three species of *Tripogandra* Raf. (Commelinaceae) with different ploidy levels. *Genet Mol Biol* 33:731-738. doi: 10.1590/S1415-47572010005000085

Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Ann Bot* 92: 309-316. doi: 10.1093/aob/mcg138

Melo NF, Guerra M, Benko-Iseppon AM, Menezes NL (1997) Cytogenetic and cytotaxonomy of Velloziaceae. *Plant Syst Evol* 204:257-273. doi: 10.1007/BF00989209

Moraes AP, Filho WSS, Guerra M (2007) Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosom Res* 15:115-121. doi: 10.1007/s10577-006-1101-2

Moraes AP, Guerra M (2010) cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Syst Evol* 287:113-118. doi: 10.1007/s00606-010-0302-5

Ndimele PE, Kumolu-Johnson CA, Anetekhai MA (2011) The invasive aquatic macrophyte, water hyacinth [*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solm-Laubach: Pontederiaceae]: problems and prospects. *Res J Environ Sci* 5:509-520. doi: 10.3923/rjes.2011.509.520

Neiff AP, Carignan R (1997) Macroinvertebrates on *Eichhornia crassipes* roots in two lakes of the Paraná River floodplain. *Hydrobiol* 345:185-196. doi: 10.1023/A:1002949528887

Ness RW, Graham SW, Barrett SCH (2011) Reconciling gene and genome duplication events: using multiple nuclear gene families to infer the phylogeny of the aquatic plant family Pontederiaceae. *Mol Biol Evol* 28:3009-3018. doi: 10.1093/molbev/msr119

Pedrosa A, Gitaí J, Silva AEB, Felix LP, Guerra M (1999) Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Bot Bras* 13:49-60. doi: 10.1590/S0102-33061999000100006

Pedrosa A, Sandal N, Stougaard J, Schweizer D, Bachmair A (2002) Chromosomal map of the model legume *Lotus japonicus*. *Gen* 161:1661-1672

Pedrosa-Harand A, De Almeida CCS, Mosiolek M, Blair MW, Schweizer D, Guerra M (2006) Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theor Appl Genet* 112:924-933. doi: 10.1007/s00122-005-0196-8

Pott VJ, Pott A (2002) Plantas aquáticas do Pantanal. Embrapa, Brasília

Raven PH (1975) The bases of angiosperm phylogeny: cytology. *Ann Mo Bot Gard* 62:724-764. doi: 10.2307/2395272

Redi CA, Garagna S, Zacharias H, Zuccotti M, Capanna E (2001) The other chromatin. *Chromosom* 110:136-147. doi: 10.1007/s004120000114

Roa F, Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: structural and evolutionary implications 12:1-13. doi: 10.1186/1471-2148-12-225

- Schweizer D, Ambros PF (1994) Chromosome banding: stain combinations for specific regions. In: Gosden JR (ed) Chromosome analysis protocols. Methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, pp 97–112
- Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272-285. doi: 10.1038/nrg2072
- Stanley JN, Julien MH, Center TD (2007) Performance and impact of the biological control agent *Xubida infusella* (Lepidoptera; Pyralidae) on the target weed *Eichhornia crassipes* (waterhyacinth) and on a non-target plant, *Pontederia cordata* (pickerelweed) in two nutrient regimes. *Biol Control* 40: 298-305. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.12.008
- Torrell M, Cerbah M, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2003) Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): flurochromoe banding and flurescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa 239:141-153. doi: 10.1007/s00606-002-0259-0
- Urdampilleta JD, Ferrucci MS, Vanzela ALL (2005) Karyotype differentiation between *Koelreuteria bipinnata* and *K. elegans* ssp. *formosana* (Sapindaceae) based on chromosome banding patterns. *Bot J Linn Soc* 149:451-455. doi: 10.1111/j.1095-8339.2005.00440.x
- Urdampilleta JD, Coulleri JP, Ferrucci MS, Forni-martins ER (2012) Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae). *Plant Biol* 1-14. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00679.x
- Villabona-González SL, Aguirre NJ, Estrada AL (2011) Influencia de las macrófitas sobre la estructura poblacional de rotíferos y microscrustáceos em um plano de inundación tropical. *Ver Biol Trop* 59: 853-870. doi: NÃO TEM DOI
- Wanzenböck E-M, Schöfer C, Schweizer D, Bachmair A (1997) Ribosomal transcription units integrated via T-DNA transformation associate with the nucleolus and do not require upstream repeat sequences for activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 11:1007-1016. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051007.x
- Weiss H, Maluszynska J (2000) Chromosomal rearrangement in autotetraploid plants of *Arabidopsis thaliana*. *Her* 133: 255-261. doi: 10.1111/j.1601-5223.2000.00255.x
- Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM (2013) Karyotype diversity and evolutionary trends in angiosperms. In: Leitch IJ, Greilhuber J, Dplezel J, Wendel J (eds). *Plant genome diversity volume 2: physical structure, behavior and evolution of plant genomes*, 2nd edn. Wien, Springer-Verlag, pp 209-230
- Wiche S, Costa A, Muñoz J, Quandt D (2011) Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. *Mol Phyl Evol* 61:321-332. doi: 10.1016/j.ympev.2011.06.023

APÊNDICES

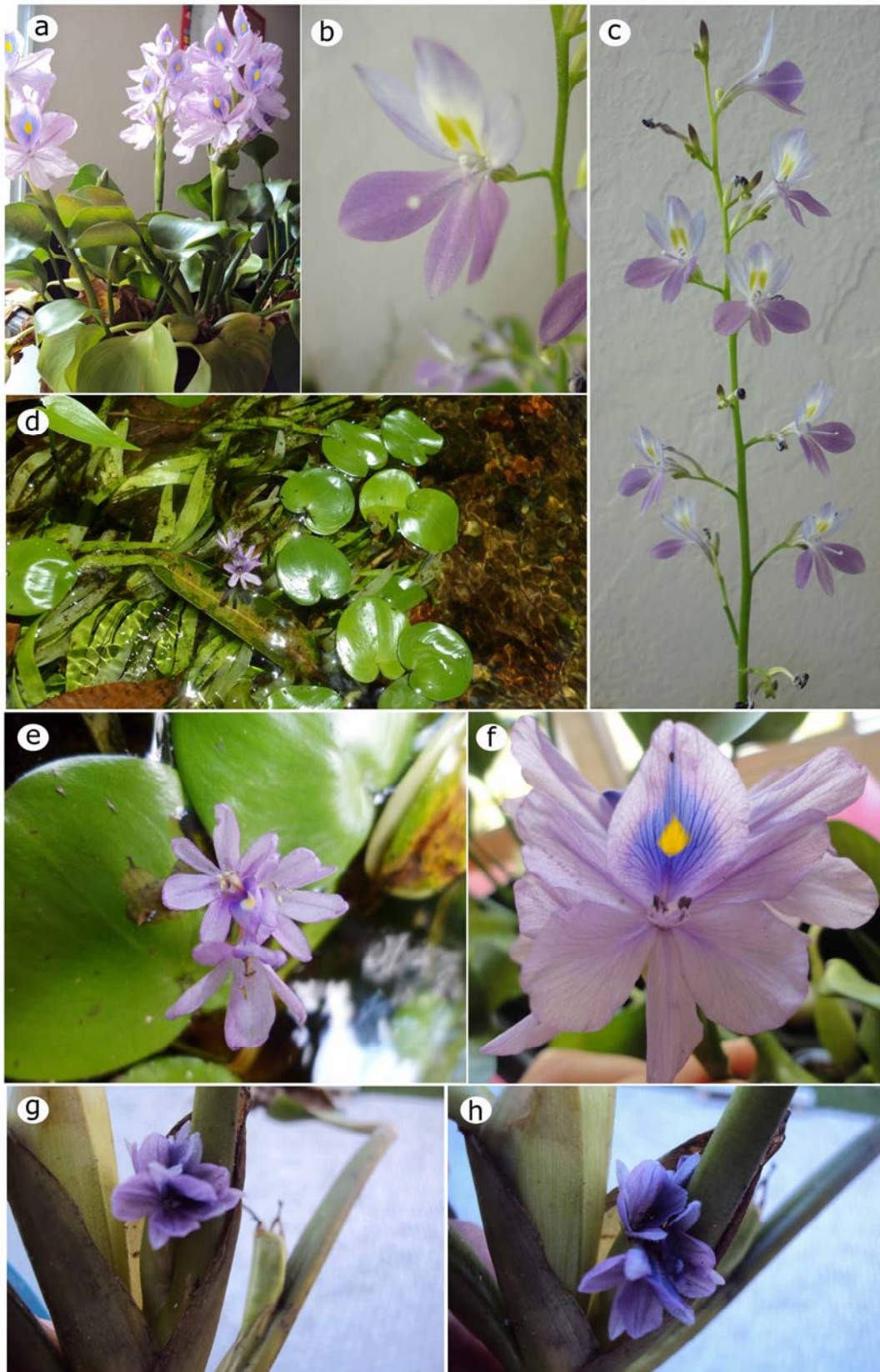


Fig. 1 Espécies do gênero *Eichhornia*: *E. crassipes* (a, f), *E. paniculata* (b, c), *E. diversifolia* (d, e) e *E. heterosperma* (g, h).

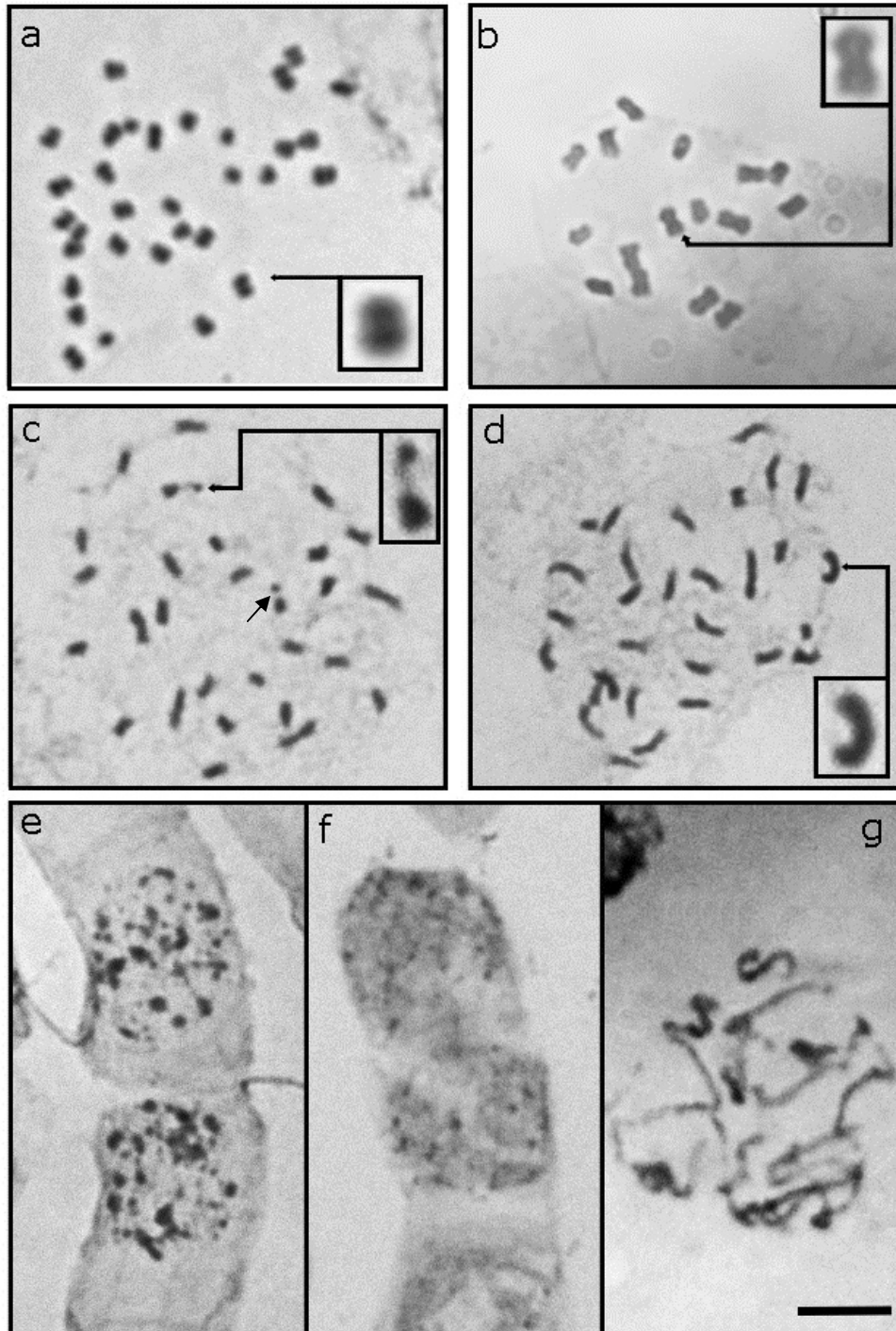


Fig. 2 Coloração com Giemsa em espécies de *Eichhornia*. *E. crassipes* (a, $2n = 32$), *E. paniculata* (b, $2n = 16$; e, núcleo interfásico semi-reticulado; g, prófase), *E. diversifolia* (c, $2n = 28$; f, núcleo arreticulado) e *E. heterosperma* (d, $2n = 30$). Os insertos mostram cromossomos ampliados. Em (c) o inserto exibe um cromossomo satelitado com RON distendida e seta indica o satélite do cromossomo homólogo. A barra corresponde a 5 μm

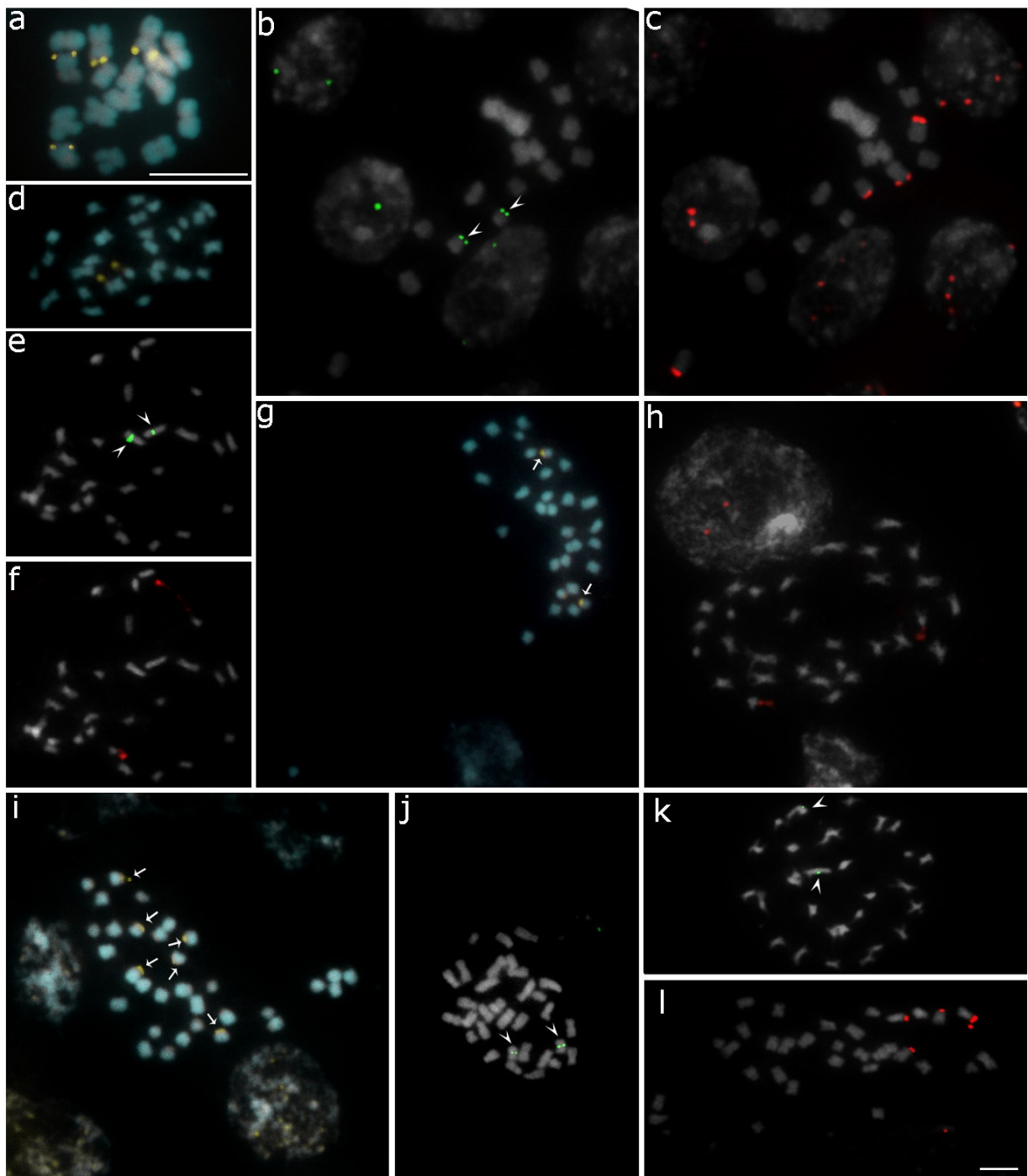


Fig. 3 Heterocromatina e sítios de DNAr em cromossomos de *Eichhornia*. *E. paniculata* (a - CMA/DAPI; b - DNAr 5S, c - DNAr 45S), *E. diversifolia* (d - CMA/DAPI, e - DNAr 5S, f - DNAr 45S), *E. heterosperma* (g - CMA/DAPI, h - DNAr 45S, k - DNAr 5S) e *E. crassipes* (i - CMA/DAPI, j - DNAr 5S, l - DNAr 45S). Setas indicam bandas CMA⁺. Cabeças de setas indicam sítios de DNAr 5S. As barras correspondem a 5 μ m

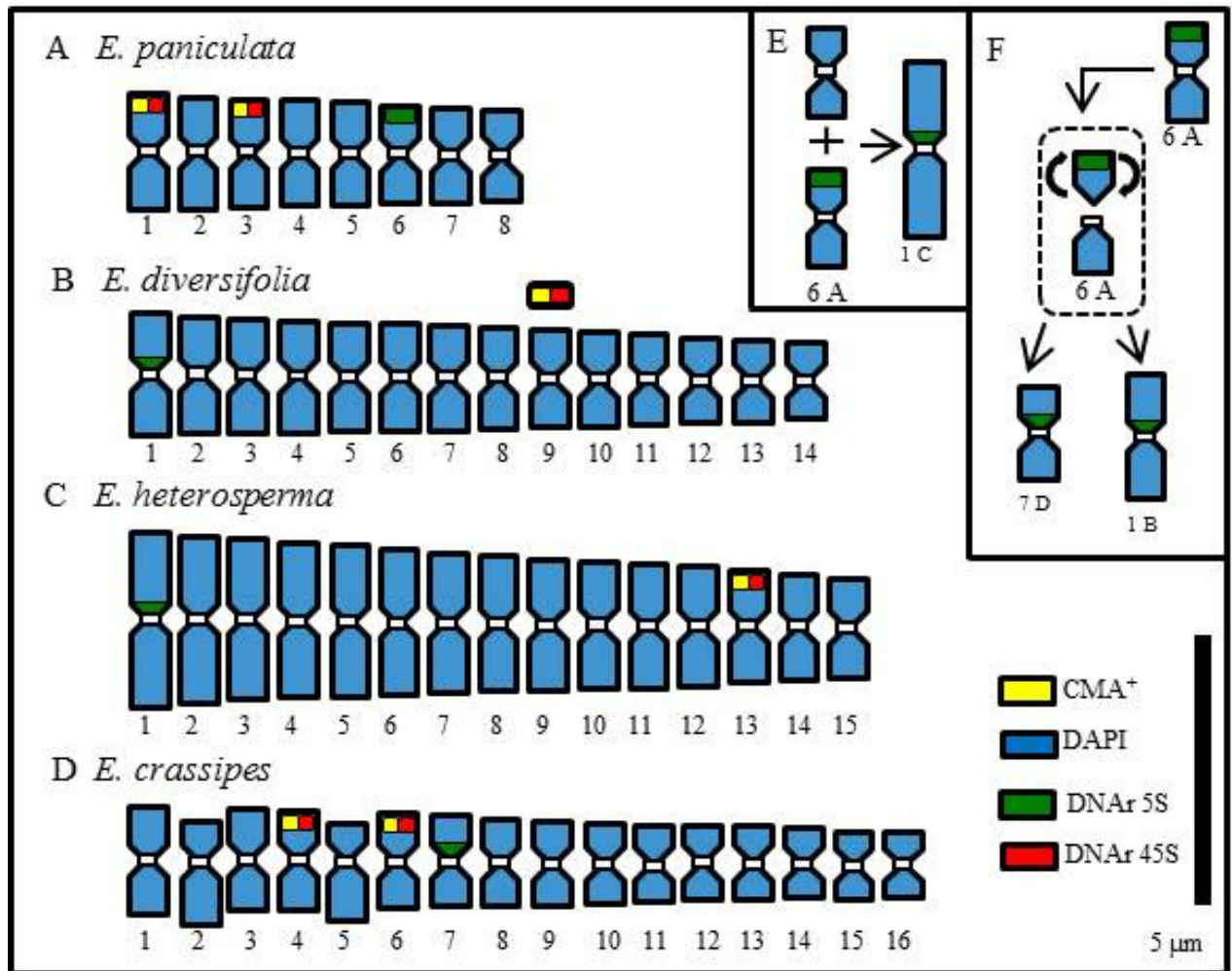


Fig. 4 Representação esquemática dos cromossomos das espécies de *Eichhornia*. *E. paniculata* (A), *E. diversifolia* (B), *E. heterosperma* (C) e *E. crassipes* (D). Representação da possível fusão (E) em *E. heterosperma* e fissão e inversão em *E. diversifolia* (1B) e *E. crassipes* (7D).

Tabela 1 Caracterização morfométrica das espécies de *Eichhornia*. PC (par cromossômico), CTC (comprimento total de cada cromossomo), BL (braço longo), BC (braço curto), R (razão), IC (índice centromérico), TC (tipo de cromossomo), M (metacêntrico). Valores em μm

PC	<i>E. crassipes</i>					<i>E. heterosperma</i>					<i>E. diversifolia</i>					<i>E. paniculata</i>					TP
	CTC	BL	BC	R	IC	CTC	BL	BC	R	IC	CTC	BL	BC	R	IC	CTC	BL	BC	R	IC	
1	1,61±0,23	0,88±0,18	0,72±0,12	1,25	0,45	2,94±0,44	1,57±0,22	1,37±0,24	1,15	0,47	2,18±0,29	1,16±0,17	1,01±0,14	1,15	0,47	1,78±0,19	0,94±0,10	0,84±0,11	1,13	0,47	M
2	1,46±0,20	0,83±0,16	0,63±0,08	1,32	0,44	2,57±0,34	1,39±0,21	1,18±0,15	1,18	0,46	1,90±0,20	1,03±0,14	0,87±0,09	1,19	0,46	1,66±0,17	0,88±0,09	0,78±0,10	1,13	0,47	M
3	1,40±0,18	0,81±0,12	0,59±0,08	1,40	0,42	2,33±0,28	1,21±0,15	1,12±0,14	1,08	0,48	1,77±0,17	0,95±0,11	0,82±0,08	1,16	0,46	1,59±0,17	0,84±0,11	0,75±0,08	1,12	0,47	M
4	1,34±0,15	0,71±0,09	0,64±0,08	1,12	0,47	2,21±0,29	1,20±0,18	1,01±0,15	1,19	0,46	1,67±0,19	0,88±0,09	0,79±0,12	1,13	0,47	1,52±0,16	0,81±0,09	0,71±0,08	1,14	0,47	M
5	1,29±0,13	0,70±0,08	0,58±0,07	1,22	0,45	2,15±0,28	1,15±0,16	1,00±0,14	1,16	0,46	1,58±0,17	0,84±0,11	0,74±0,07	1,13	0,47	1,45±0,15	0,76±0,08	0,68±0,08	1,12	0,47	M
6	1,25±0,13	0,68±0,09	0,58±0,08	1,18	0,46	2,08±0,24	1,09±0,12	0,99±0,13	1,10	0,48	1,49±0,12	0,82±0,09	0,67±0,06	1,23	0,45	1,38±0,14	0,74±0,07	0,64±0,09	1,18	0,46	M
7	1,22±0,13	0,69±0,10	0,52±0,06	1,33	0,43	2,00±0,22	1,08±0,13	0,92±0,12	1,18	0,46	1,43±0,12	0,76±0,07	0,67±0,07	1,15	0,47	1,29±0,10	0,68±0,06	0,60±0,06	1,14	0,47	M
8	1,18±0,12	0,65±0,08	0,53±0,07	1,23	0,45	1,94±0,20	1,01±0,11	0,93±0,09	1,10	0,48	1,37±0,12	0,74±0,07	0,63±0,06	1,17	0,46	1,18±0,10	0,62±0,06	0,55±0,05	1,13	0,47	M
9	1,14±0,12	0,62±0,08	0,52±0,05	1,20	0,46	1,90±0,18	1,00±0,11	0,90±0,09	1,12	0,47	1,31±0,12	0,70±0,07	0,61±0,05	1,15	0,47						M
10	1,10±0,12	0,60±0,08	0,51±0,06	1,18	0,46	1,81±0,14	0,97±0,09	0,84±0,08	1,16	0,46	1,23±0,11	0,66±0,07	0,58±0,05	1,14	0,47						M
11	1,07±0,12	0,59±0,07	0,49±0,07	1,23	0,45	1,75±0,15	0,92±0,08	0,82±0,08	1,12	0,47	1,17±0,10	0,63±0,06	0,54±0,06	1,18	0,46						M
12	1,03±0,11	0,57±0,08	0,46±0,06	1,25	0,45	1,67±0,15	0,88±0,08	0,79±0,08	1,11	0,47	1,12±0,09	0,58±0,05	0,54±0,05	1,09	0,48						M
13	0,97±0,09	0,52±0,05	0,45±0,05	1,16	0,46	1,58±0,13	0,83±0,07	0,75±0,07	1,12	0,47	1,05±0,09	0,56±0,05	0,50±0,05	1,13	0,47						M
14	0,90±0,07	0,47±0,04	0,43±0,05	1,11	0,48	1,49±0,11	0,79±0,08	0,70±0,05	1,12	0,47	0,94±0,09	0,51±0,06	0,43±0,05	1,18	0,46						M
15	0,83±0,06	0,44±0,04	0,39±0,04	1,14	0,47	1,30±0,11	0,69±0,08	0,61±0,06	1,15	0,47											M
16	0,73±0,10	0,39±0,05	0,34±0,05	1,16	0,46																M

± Equivale ao desvio padrão

Silva, M. L. Citogenética em espécies do gênero *Eichhornia* Kunth...

Tabela 2 Lista de espécies do gênero *Eichhornia* com sinônimos, complemento cromossômico total, números cromossômicos (do presente estudo e contagens prévias) e referências

Espécie	Sinônimos ¹	Presente estudo		Trabalhos anteriores		
		2n	Complemento total em μm	n	2n	Referências
<i>E. crassipes</i> (Mart.) Solms	<i>Pontederia crassipes</i> Mart., <i>Pontederia crassipes</i> Roem. & Schult., <i>Pontederia elongata</i> Balf., <i>Eichhornia cordifolia</i> Gand., <i>Eichhornia crassicaulis</i> Schltr., <i>Eichhornia speciosa</i> Kunth, <i>Heteranthera formosa</i> Miq., <i>Piaropus crassipes</i> (Mart.) Raf., <i>Piaropus mesomelas</i> Raf., <i>Piaropus tricolor</i> Raf., <i>Pontederia azurea</i> Sw., <i>Pontederia crassicaulis</i> Schltr.,	32	154.84	9	32	Fedorov, 1969; Goldblatt, 1981; 1985; Goldblatt & Johnson, 1990; 1991; Pedrosa et al. 1999.
<i>E. diversifolia</i> (Vahl) Urb.	<i>Eichhornia natans</i> var. <i>pauciflora</i> (Seub.) Solms, <i>Eichhornia pauciflora</i> Seub., <i>Heteranthera cordata</i> Vahl, <i>Heteranthera diversifolia</i> Vahl, <i>Heteranthera grandiflora</i> Klotzsch, <i>Piaropus diversifolius</i> (Vahl) P. Wilson	28	168.99	15		Eckenwalder & Barrett, 1986.
<i>E. heterosperma</i> Alexander	<i>Eichhornia venezuelensis</i> Velásquez	30	248.44	15		Eckenwalder & Barrett, 1986.
<i>E. paniculata</i> (Spreng.) Solms	<i>Cabanisia martiana</i> (Seub.) Schltld., <i>Pontederia paniculata</i> Spreng., <i>Eichhornia cordifolia</i> A. Rich., <i>Eichhornia martiana</i> Seub., <i>Eichhornia meyeri</i> A. G. Schulz, <i>Eichhornia tricolor</i> Seub., <i>Eichhornia martiusiana</i> (Roem. & Schult.) Walp., <i>Piaropus paniculatus</i> (Spreng.) Small, <i>Pontederia tricolor</i> C. Mart. ex Seub., <i>Pontederia martiana</i> Seub., <i>Pontederia martiusiana</i> Roem. & Schult..	16	98.94	-	16	Fedorov, 1969; Pedrosa et al. 1999.

¹ Sinônimos de acordo com o Missouri Botanical Garden

ANEXO

NORMAS DA REVISTA **PLANT SYSTEMATICS AND EVOLUTION**

Instructions for Authors

EDITORIAL PROCEDURE

Authors are kindly asked to provide a list of reviewers including their scientific relations. Furthermore a short explanation (two sentences) of their findings should be given.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.

Genus and species names should be in italics.

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

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."

REFERENCES**Citation**

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

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 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.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numb.